SÉRIE A, N° 4552
N° D'ORDRE : 5399

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude HERMIER

PREMIÈRE THÈSE

## Purification et propriétés physico-chimiques et biologiques de l'hormone Hypophysaire Folliculo Stimulante (FSH) de mouton

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Dosages immunologiques des hormones antéhypophysaires
Antihormones

Soutenues le 18 mai 1965, devant la Commission d'examen

| | | |
|---|---|---|
| MM. | A. JOST | *Président* |
| | F. MOREL | *Examinateur* |
| | H. CLAUSER | *Rapporteur* |

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534911_0047

SÉRIE A, N· 4552
N· D'ORDRE : 5399

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude HERMIER

PREMIÈRE THÈSE

## Purification et propriétés physico-chimiques et biologiques de l'hormone Hypophysaire Folliculo Stimulante (FSH) de mouton

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Dosages immunologiques des hormones antéhypophysaires
Antihormones

Soutenues le 18 mai 1965, devant la Commission d'examen

MM. A. JOST — *Président*
F. MOREL — *Examinateur*
H. CLAUSER — *Rapporteur*

UNIV. LEIDEN BIBL.

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

## PROFESSEURS

Doyen M. ZAMANSKY

| | | |
|---|---|---|
| MM | BRELOT | T Analyse supérieure |
| | PRENANT | T Anatomie et histologie comparée |
| | GRASSE | T Evolution des êtres organisés |
| | PREVOST | T Chimie Organique |
| | WYART | T Minéralo & Cristallo |
| | TEISSIER | T Zoologie |
| | MANGENOT | T Biologie végé. (Orsay) |
| | AUGER | T Physique quantique et relativité |
| | MONNIER | T Physiologie générale |
| | PIVETEAU | T Paléontologie |
| | ROCARD | T Physique ENS |
| | CARTAN | T Mathématiques ENS |
| | LAFFITTE N. | T Chimie générale |
| | COULOMB | T Physique du globe |
| Mlle | COUSIN | T Biologie animale SPCN |
| | CHRETIEN | T Chimie minérale |
| | BOCQUET | T Zoologie |
| | KASTLER | T Physique ENS |
| | EPHRUSSI | T Génétique |
| | RIVIERE | T Géologie SPCN & Sédiment (Orsay) |
| | GAUTHERET | T Biologie végétale PCB |
| | LUCAS R. | T Recherches Physiques |
| | TOHMAS A. | T Biologie cellulaire |
| | ARNULF | T Optique appliquée |
| | MORAND | T Physique enseignement |
| | SOLEILLET | T Physique PCB |
| | PORTIER | T Mécanique exp. des fluides |
| | DRACH | T Zoologie |
| | QUENEY | T Météo & Dynamique atmos. |
| | GALLIEN | T Embryologie |
| | EICHORN | T Botanique |
| | DE CUGNAC | T Biologie végétale SPCN |
| Mlle | CAUCHOIS | T Chimie physique |
| | THELLIER | T Physique du globe |
| | L'HERITIER | T Biologie générale Orsay |
| | GRIVET | T Radioélectricité Orsay |
| | PONCIN | T Mécanique générale |
| | DU BREIL | T Arith & Théorie des nombres |
| | QUELET | T Chimie organique |
| | GAGNIARD | T Géophysique appliquée |
| | CHAMPETIER | T Chimie macromoléculaire |
| | CUVILLIER | T Micropaléontologie |
| | JUNG | T Géologie |
| | TRILLAT | T Microscopie et diffraction électro. |
| | WIEMANN | T Chimie organ & struc |
| | JACQUINOT | T Spectroscopie et Physique céleste (Orsay) |
| | VASSY | T Physique de l'atmosphère |
| | DESTOUCHES | T Théorie physique |
| | AMIEL | T Chimie générale |
| | HOCART | T Minéralo. & Cristalo. |
| | MATHIEU J. P. | T Physique optique |
| | COUTEAUX | T Cytologie |
| | MAY | T Zoologie |
| | CHOQUET | T Théorie des fonctions et topologie |
| | FELDMANN | T Biologie végétale marine |
| | GUINIER | T Physique des solides (Orsay) |
| | JOST | T Physiologie comparée |
| | FORTET | T Calcul des probabilités et Phys. Mathém. |
| | SCHWARTZ | T Calcul diff. & Intégral |
| | CHOUARD | T Physiologie végétale |
| | MALAVARD | T Aviation (Tech. Aéron.) |
| | NORMANT | T Symbèse organique |
| | BENARD | T Chimie minérale |
| | BUVAT | T Botanique ENS |
| | DUGUE | T Statistique mathématiques |
| | SOULAIRAC | T Psychophysiologie |
| | ULRICH | T Physiologie Vég. Appl. |
| | MARECHAL | T Optique théor. & appl |
| | KIRRMANN | T Théories chimiques |
| | CHADEFAUD | T Botanique |
| Mlle | LE BRETON | T Physiol. de la nutrition |
| | LELONG | T Application de l'analyse à la géométrie |
| | DEVILLERS | T Anatomie & Histo compar. |
| | EHRESMANN | T Topologie algébrique |
| | FRANCON | T Physique SPCN |
| | GLANGEAUD | T Géographie phys. & géol. |
| | GODEMENT | T Mathématiques MGP |
| | PISOT | T Technique math. de la phys. |
| | ROCH | T Géologie |
| | SCHATZMANN | T Astrophysique |
| | TERMIER | T Géologie générale |
| | ZAMANSKY | T Mathématiques générales |
| | LENNUIER | T Physique MGP |
| | RIZET | T Génétique Orsay |
| | ROUTHIER | T Géologie appliquée |
| Mme | TONNELAT | T Physique théorique |
| | DEMIER | T Mathématiques MPC |
| | SOUCHAY | T Chimie générale |
| | AIGRAIN | T Electrotechnique générale |
| | BRUSSET | T Chimie systématique |
| | LEVY M. | T Physique théorique des hautes énergies (Orsay) |
| Mme | CHAIX | T Chimie biologique |
| Mme | HUREL PY | T Biologie végétale PCB |
| | PANNETIER | T Chimie générale |
| | BRUN | T Mécanique des fluides I |
| | LEDERER | T Chimie biologique (Orsay) |
| Mme | DUBREIL | T Mathématiques (Agrég.) |
| Mme | LELONG | T Mathématiques II ENS |
| | BELLAIR | T Géologie SPCN |
| | COTTE | T Physique électricité |
| | DUBOIS J. E. | T Chimie organique |
| | LAMOTTE | T Zoologie ENS |
| | MICHEL A. | T Chimie minérale Orsay |
| | OLMER | T Energétique générale |
| | ROUAULT | T Electricité (Orsay) |
| | GAUTHIER | T Mécanique appliquée |
| | BARCHEWITZ | T Chimie physique |
| | BROSSEL | T Physique atomique |
| | BUSER | T Physiologie comparée |
| | CAMUS | T Physiologie végétale |
| | CASTAING | T Physique II Thermo (Orsay) |
| | CURIEN | T Minéralo. & cristal. |
| | MOYSE | T Physiologie végétale (Orsay) |
| Mme | CHARNIAUX-COTTON | T Evolution des êtres organisés |
| | POSSOMPES | T Zoologie |
| | PULLMANN | T Chimie quantique |
| | TEILLAC | T Physique Nucl. & radioactivité (Orsay) |
| | TONNELAT | T Biol. Physico-chim. (Orsay) |
| | VILLE | T Econométrie |
| | WILLEMART | T Chimie PCB |
| | DODE | T Chimie (Orsay) |
| | FREYMANN | T Recherches physiques |
| | GUINOCHET | T Biologie végétale SPCN (Orsay) |
| | ROLLET | T Chimie minérale |
| Mlle | JOSIEN | T Chimie SPCN |
| | CHEVALLEY | T Géométrie algéb. et théorie des groupes |
| | ARNOULT | T Electronique Ormay |
| | CHAPELLE | T Physique I (Orsay) |
| | DELANGE | T Mathématiques I (Orsay) |
| | DENY | T Mathématiques générales (Orsay) |
| | GERMAIN | T Mécanique théorique des fluides |
| | LUCAS | T Géologie |
| | ALLARD | T Chimie physique |
| | BERTHELOT | T Physique des particules fondamentales (Orsay) |
| | BRICARD | T Météor. et physique de l'atmosphère |
| Mme | ALBE FESSARD | T Psycho physio |
| | FRIEDEL | T Physique des solides (Orsay) |
| | JULIA M. | T Etudes des moléculaires complexes |
| | LENDER | T Biologie animale SPCN (Orsay) |
| | MAGAT | T Physico chimie des radioéléments |
| Mlle | QUINTIN | T Electrochimie |
| | MONOD | T Chimie du métabolisme |
| | BENOIT | T Physio. animale (Orsay) |
| | DE POSSEL | T Analyse numérique |
| | CHARLOT | T Chimie analytique |
| | LEMEE | T Ecologie végétale (Orsay) |
| | GUERIN | T Chimie MPC (Orsay) |
| | CHATELET | T Chimie PCB |
| | JEAN | T Physio. nucléaire (Orsay) |
| | MATTLER | T Physique SPCN |
| | BERGERARD | T Zoologie (Orsay) |
| | BERTEIN | T Electronique (Orsay) |
| | BOUISSIERES | T Radiochimie |
| Mme | COUTURE | T Thermo. et méca. physique |
| | ETLINGER | T Géologie des grandes régions du globe (Orsay) |
| | FRANC | T Biologie animale PCB |
| | SCHNELL | Botanique tropicale |
| | STLKOWSKI | T Physiologie végétale |
| | ACHER | T Chimie biologique |
| | BAUDOIN | T Biologie animale PCB |
| | BEAUMONT | Biologie animale SPCN |
| | BLAMONT | Géophysique ionosphère |
| | BOUREAU | T Botanique |
| | CURIE D. | Physique MGP |
| | DURAND DELGA | T Géologie |
| | FREON | T Chimie organique (Orsay) |
| | HELLER | T Physiologie végétale |
| | TORTRAT | T Calcul des probabilités |
| | CAILLEUX | T Géologie SPCN |
| | MAGNAN | Physique électricité |
| | DAUDEL | T Mécanique ondulatoire appli. à la Chimie Théor. & à la Phys. Nucléaire |
| Mlle | FOURCROY | Biologie végétale SPCN |
| Mme | CHOQUET BRUHAT | Mécanique analytique et méca. céleste |
| Mlle | VEIL | T Physiologie générale |
| | LWOFF | T Microbiologie |
| | SIESTRUNCK | T Méca. phys. & expérimentale |
| | LACOMBE | T Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay) |
| | BROCHARD | T Physique PCB (Orsay) |
| | CABANNES | T Mécanique générale |
| | LESIEUR | T Math. I (Orsay) |
| | MAZET | T Méca. générale (Orsay) |
| | CAIRE | Géographie physique et géo. dynamique |
| | COMOLET | Méca. des fluides |
| | CORABOEUF | T Physiologie animale (Orsay) |
| | DELLOUE | T Physique de l'atmosphère |
| | GORENFLOT | Botanique II (Orsay) |
| | HOUILLON | Biologie animale PCB |
| | JULLIEN J. | Chimie SPCN (Orsay) |
| | MALGRANGE | T Technique Math. de la physique (Orsay) |
| | OLIVIER | Anthropologie |
| | NOZERAN | T Botanique II (Orsay) |
| | BLANC-LAPIERRE | T Physique ENS (Orsay) |
| | CHEVAUGEON | T Botanique (Orsay) |
| | KAHANE | T Mathématiques (Orsay) |
| | SAMUEL | T Mathématiques ENS féminines |
| | KOURGANOFF | T Astronomie (Orsay) |
| | THIRY | T Méca. céleste |
| | ARELES | Physique SPCN |
| | AMAT | T Physique PCB |
| | AUBOIN | T Géologie |
| Mme | BENOIT-GUEUTAL | T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay) |
| | BOUGIS | Biologie marine Villefranche/mer |
| | BRUHAT | T Math. MPC |
| | BRUNN | T Géologie historique (Orsay) |
| | CHARBAL | T Physique MGP (Orsay) |
| | DEHEUVELS | T Math. propé. |
| | D'ESPAGNAT | T Physique théorique (Orsay) |
| | FURON | T Géologie SPCN |
| Mme | GANS | T Génétique |
| | GENEVES | Biologie végétale PCB |
| | GUILBERT | Physique CUS Orléans |
| | HUPE | T Pétrographie |
| | HOLLANDE | T Biologie générale |
| | LIONS | T Analyse numérique |
| | MAITTE | T Chimie PCB |
| | MEYER | Physique propédeutique |
| | PANIGEL | Biologie générale |
| | RAVIER | Pétrographie |
| | ROSEAU | T Méca. théorique des fluides |
| | ROUBINE | Electronique |
| | SILBER | T Chimie PCB |
| | UEBERSFELD | T Electronique |
| | YVON | T Théories physiques |
| | HERVE | T Mathématiques |
| | NERON | T Math. MPC (Orsay) |
| Mme | PECKER WIMEL | T Astrophysique |
| | BALKANSKY | Physique MPC |
| | LE CORRE | T Electricité |
| | DELCROIX | T Physique théorique (Orsay) |
| | GOURDIN | Physique théorique des hautes énergies (Orsay) |
| | LEHMANN | T Phys. Exp. des hautes énergies |
| | NATAF | T Physique nucléaire et radioactivité (Orsay) |
| | ECHALIER | Biologie animale PCB |
| | BARRAUD | Physiologie cellulaire |
| | LIORET | Physiologie végétale (Orsay) |
| | DARS | Géologie structurale et Géologie appliquée |
| | CAMEFORT | T Botanique (agrégation) |
| | VICHNIEWSKY | T Mécanique industrielle |
| | BLAQUIERE | Electronique (Orsay) |
| | ARNOUS | T Physique théorique |
| | TATIBOUET | Chimie (CSU Orléans) |
| | MALLIAVIN | T Mathématiques propé. (Orsay) |
| | GAUDEMAR | Chimie propé |
| | PEREZ Y JORBA | Physique Exp des hautes énergies (Orsay) |
| | DAVID | T Chimie (agrégation Orsay) |
| | BROUSSE | T Mécanique théorique |
| | ROSCH | T Astronomie |
| | GUY | T Physique expérimentale |
| | LAZARD | Math MPC |
| | MOREL P. | Physique MPC |
| | ARSAC | Programmation |
| | LEFEBVRE | Chimie MPC |
| | CHAPEVILLE | Biochimie |
| | BENOIT | Physique CPEM |
| | RIO | Chimie CPEM |
| | JAUZEIN | Géologie ENS |
| | PREVOST G. | BV CPEM |
| | FAVARD P. | BA CPEM |
| | VILKAS | Chimie CPEM |
| Mlle | FICINI | Chimie CPEM |
| | LEQUEUX | Astronomie |
| | COHEN TANNOUDJI | Physique MPC |
| | TAVERNIER | Physique CPEM |
| Mme | ROZEN | Physique CPEM |
| | DURAND M. | BA SPCN |
| | PASCAUD | Physiologie |
| Mme | PETIT | BA CPEN |
| | BROUSSE | Géologie (Orsay) |
| | CAGNAC | Physique agrégation (Orsay) |
| | LEBERRE | Zoologie (Orsay) |
| | SCHEFFER | Microbiologie (Orsay) |
| | de GENNES | Physique des solides (Orsay) |
| | RIOU | Physique nucléaires exp. (Orsay) |
| | CLAUSER | Chimie biologique (Orsay) |
| | CHEVALIER | Physiologie animale (Orsay) |
| | JANCOVICI | Physique atomique (Orsay) |
| | FALK-VAIRANT | Physique nucléaire (Orsay) |
| | PETITZON | Chimie propé. (Orsay) |
| | CERF | Mathématiques (Orsay) |

Secrétaire général R. POULAIN

# PRÉFACE

Ce travail a été suggéré et dirigé dans sa partie biologique par Monsieur le Professeur R. COURRIER Secrétaire Perpétuel de l'Académie des Sciences, Professeur au Collège de France.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon très respectueux attachement.

Je dois à Monsieur M. JUTISZ, Directeur Scientifique au C.N.R.S., ma formation de chercheur et la direction de ma thèse.

Je voudrais l'assurer de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier tout particulièrement les membres du jury :

Monsieur le Professeur A. JOST qui a bien voulu en accepter la présidence après avoir suivi périodiquement les progrès de mes recherches et m'avoir prodigué ses conseils.

Monsieur le Professeur H. CLAUSER pour avoir accepté de juger ce travail en particulier dans sa partie biochimique.

Monsieur le Professeur F. MOREL pour sa bienveillante attention dans l'examen du manuscrit.

Je voudrais remercier aussi Mme A. COLONGE et M. P. de la LLOSA qui m'ont aidé respectivement dans les études biologique et chimique de cette hormone.

Enfin je remercie également pour leur précieuse aide technique dans l'exécution de mon travail Mmes M. TOLLET, G. RIBOT, M. ROY, P. de la LLOSA, M.F. STOLL et Mrs. G. VASSENT et G. PERONNET.

# INTRODUCTION

L'antéhypophyse secrète, d'après les connaissances actuelles, plusieurs hormones et enzymes que l'on désigne comme suit :

La STH(*) ou GH, l'ACTH, la TSH, la FSH et l'ICSH ou LH, un facteur de mobilisation des graisses, (Adipokinetic component) et deux enzymes protéolytiques (Proteinases I et II). (1).

Parmi ces hormones et enzymes antéhypophysaires, seules FSH et, accessoirement, LH nous intéresseront. Le problème de la purification des hormones gonadotropes, FSH et LH, présente en effet, un grand intérêt du point de vue de l'endocrinologie sexuelle.

Ces deux hormones étudiées depuis plus de trente ans, n'ont jamais encore été obtenues à l'état homogène et le rôle biologique exact de chacune d'elles n'est connu qu'approximativement. On sait qu'elles agissent en synergie, mais il serait intéressant de connaître la part jouée par chacune d'elles dans le cycle sexuel.

Dans la première partie de ce travail, nous avons réuni les données bibliographiques concernant la préparation, ainsi que les propriétés biologiques et physico-chimiques des gonadotropines antéhypophysaires.

La seconde partie est consacrée aux résultats expérimentaux.

Après une courte description des dosages biologiques utilisés, nous rapportons stade par stade l'étude de la purification de la FSH de mouton jusqu'au produit "Sx" hautement purifié. Nous avons étudié ensuite l'homogénéité de ce produit, ses propriétés physico-chimiques et sa stabilité biologique.

---

(*) Les sigles suivants seront utilisés :
- STH ou GH : Growth Hormone ; hormone de croissance ou hormone somatotrope
- ACTH : Adrenocorticotropic Hormone ; hormone corticotrope
- TSH : Thyroid-stimulating Hormone ; hormone thyréotrope
- LTH : Luteotropic Hormone ; hormone lutéotrope ou prolactine.
- FSH : Follicle Stimulating Hormone ; hormone folliculo stimulante ou thylakentrin ou prolan A.
- ICSH ou LH : Interstitial Cell Stimulating Hormone ou Luteinizing Hormone ; hormone lutéinisante ou prolan B ou métakentrin.
- HCG : Human chorionic gonadotropin, ou gonadotropine choriale humaine.
- PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotropin, ou gonadotropine du serum de jument gravide.

Enfin nous rapportons quelques résultats obtenus en injectant la FSH hautement purifiée chez le rat mâle hypophysectomisé.

Une discussion des différents points qui nous semblent importants et nouveaux dans ce travail termine cette mise au point.

# CHAPITRE I

# HISTORIQUE

## A - DECOUVERTE DES GONADOTROPINES

La mise en évidence des gonadotropines antéhypophysaires a été effectuée en plusieurs étapes.

C'est d'abord la pathologie qui attire l'attention sur les relations entre l'hypophyse et la sphère génitale avec la description du syndrome adiposo-génital de BABINSKI (1900) (8) et FROELICH (1901) (50). Puis, en 1910, CUSHING et ASCHNER (7) effectuent l'hypophysectomie chez le chien. Ils notent, entre autre, un arrêt de la fonction génitale après cette intervention.

Les premiers extraits d'hypophyses totales sont effectués en 1921 par EVANS et LONG (39). Ces extraits hydroalcalins sont injectés à des souris afin de rechercher une activité somatotrope. Les auteurs observent à côté de cette activité, une action très forte sur les ovaires de leurs animaux avec arrêt du cycle oestral. Les doses massives employées alors, ainsi que la durée des expériences qui était de plusieurs mois, permettent d'expliquer aujourd'hui ces résultats d'inhibition.

Il faut attendre 1925-1926 (5, 24) pour trouver les premiers travaux mettant nettement en évidence la présence des gonadotropines d'origine hypophysaire. C'est en effet ZONDEK en 1926 (152) qui, le premier, déclenche la puberté précoce chez la souris par des implantations d'hypophyses animales ou humaines. ZONDEK et ASCHHEIM (151) la même année, grâce à l'application de nouveaux tests cytologiques qui permettent de suivre l'activité ovarienne, attribuent aux hormones hypophysaires le contrôle de trois stades importants du cycle ovarien : maturation folliculaire, hypertrophie thécale et lutéinisation. Les observations se multiplient alors très vite. P.E. SMITH en 1926-1927 (124) met au point chez le rat la technique de l'hypophysectomie par voie pharyngée. Il constate l'involution des organes sexuels après cette ablation et décrit la restauration de l'activité génitale par des implantations d'hypophyses.

En 1928, ASCHHEIM (6) observe une dissociation d'action dans les extraits hypophysaires et suggère l'existence de deux facteurs A et B.

De même, en 1929, COURRIER et KEHL (27) précisent cette dissociation d'effets par l'injection d'un extrait hydroalcalin d'hypophyses de boeuf chez la chatte. Ces auteurs peuvent, suivant la dose injectée, déclencher soit la phase folliculaire, soit la phase lutéinique, qui succède à la première, si la quantité d'extrait est augmentée.

Mais c'est en 1931 avec FEVOLD (45) que commencent effectivement les travaux d'isolement de ces hormones. FEVOLD définit aussi deux gonadotropines :

- La FSH ou hormone folliculo-stimulante qui stimule le développement folliculaire ;

- La LH ou hormone lutéinisante, qui provoque la lutéinisation du follicule après la ponte ovulaire.

De 1932 à 1936, VAN DYKE et WALLEN-LAWRENCE (34) d'une part, et EVANS (40) d'autre part, décrivent aussi deux actions gonadotropes et deux hormones : ils donnent de la FSH la même définition que ci-dessus et nomment ICSH ou Interstitial Cell Stimulating Hormone, le principe qui répare l'interstitielle ovarienne involuée après hypophysectomie.

Des travaux ultérieurs, en 1939-1940, donnent à penser que LH et ICSH sont probablement deux actions d'une même hormone [voir,(66) page 12]. A la même époque, d'autres facteurs sont décrits comme par exemple le facteur C de WITSCHI (147) facteur qui développerait la thèque folliculaire.

Par contre, certains auteurs comme M. ARON (4, 95) pensent qu'il n'existe qu'une seule gonadostimuline et que les différentes actions sont dues uniquement à des différences de doses :

- à petite dose il y aurait une action FSH.

- à forte dose une action LH.

Les résultats obtenus par de nombreux auteurs et par nous mêmes rendent cette hypothèse critiquable.

## B - PROPRIETES BIOLOGIQUES ET DOSAGES DES GONADOTROPINES

L'étude de l'action des gonadotropines antéhypophysaires ne peut être faite qu'en l'absence de la glande qui les secrète normalement. Cette évidence doit être toujours présente à l'esprit, car de nombreux travaux ont été réalisés sur des animaux impubères non hypophysectomisés. Les conclusions qui en résultent peuvent être inexactes, l'hypophyse d'un animal impubère n'étant pas complètement au repos.

### I - EFFETS DE L'HYPOPHYSECTOMIE

#### 1/ **Rats mâles**

- Chez l'impubère les testicules et les glandes annexes ne se développent pas ; il n'y a pas de spermatogénèse.

- Chez l'adulte l'effet est beaucoup plus important. L'hypophysectomie est suivie d'une forte perte de poids des testicules et la spermatogénèse s'arrête. Les glandes annexes involuent également.

#### 2/ **Rats femelles**

- Chez l'impubère les ovaires restent petits. Il n'y a pas de maturation folliculaire. L'utérus et le vagin ne se développent pas.

• Chez l'adulte l'involution des organes sexuels est forte dans ce cas. La maturation des follicules ne se fait plus. Les corps jaunes, s'ils existent, subsistent en général, sans être fonctionnels. Il y a également involution de l'utérus et disparition du cycle de l'épithélium vaginal. Les noyaux des cellules du tissu interstitiel ovarien prennent la forme dite en "rayon de roue".

## II - ACTION DES GONADOTROPINES CHEZ LES ANIMAUX HYPOPHYSECTOMISES

L'action des gonadotropines injectées à de tels animaux est principalement liée aux deux facteurs suivants :

- l'âge de l'animal au moment de l'hypophysectomie ;

- la durée de la période post-opératoire avant la première injection de gonadotropine.

Par exemple, il sera plus difficile d'établir la spermatogénèse chez un animal qui a été hypophysectomisé impubère, que de rétablir cette fonction chez un animal adulte où elle avait existé avant l'ablation de l'hypophyse.

Quant à la seconde remarque elle est liée à la reprise, possible ou non, d'une fonction hormonale après un période de repos plus ou moins longue.

Nous étudierons par conséquent, ce qui se produit en général chez un animal hypophysectomisé, les résultats décrits étant obtenus avec des doses de gonadotropines variant suivant les conditions que nous venons de voir.

### 1/ **Action de la FSH**

a) *Rats mâles* : Cette question sera discutée en détail dans le chapitre correspondant, nous n'en donnerons ici qu'un résumé. L'action sur le poids du testicule est forte. Il semble que la spermatogénèse puisse reprendre sans que l'on sache si elle peut être totale.

LOSTROH (87, 88) pense par exemple, après de nombreux auteurs, qu'en plus de FSH, il faut environ 1 µg de LH par jour ou bien un androgène, pour qu'elle puisse être complète. Nous verrons que d'après nos résultats, ces conditions ne semblent pas nécessaires.

b) *Rats femelles* : Il y a une faible action sur le poids de l'ovaire. La FSH stimule la granulosa en provoquant le développement des follicules ovariens.

### 2/ **Action de LH**

a) *Rats mâles* : L'action pondérale sur le testicule est faible.

Il y a reprise de l'activité de l'interstitielle avec sécrétion de testostérone. Par conséquent, l'action importante se fait sur les glandes annexes : prostate ventrale et vésicules séminales augmentent de poids.

b) *Rats femelles* : Aucune action n'est observée sur le poids de l'ovaire et, en l'absence de FSH, il n'y a pas de sécrétion d'oestrogène par la thèque interne.

Ce caractère différencie l'action de LH chez le mâle et chez la femelle. Cependant, il y a réparation du tissu interstitiel qui provient des follicules atrétiques.

### 3/ Action de FSH et LH associées

Comme nous venons de le voir, aucune des deux hormones ne peut remplacer à elle seule l'action de l'hypophyse et pour que la fonction génitale redevienne normale, il faut injecter un mélange des deux hormones.

a) *Rats mâles* : Les testicules reprennent un poid normal. La reprise de la spermatogénèse est aussi totale. Il y a action sur l'interstitielle qui se développe et secrète la testostérone. Suivant la proportion de LH, l'action sur les glandes annexes est plus ou moins forte.

b) *Rats femelles* : La maturation folliculaire reprend et le follicule peut être transformé en corps jaune si la quantité de LH est suffisante. L'utérus dans ces conditions, retrouve une taille normale et la cytologie vaginale redevient le témoin de l'activité ovarienne.

## III - ACTION DES GONADOTROPINES CHEZ LES ANIMAUX IMPUBERES

L'hypophyse est considérée chez les animaux très jeunes comme fonctionnant partiellement. Ces conditions physiologiques sont utilisées pour des dosages de routine, mais elles ne permettent pas d'étudier l'action des extraits hormonaux. Ce faible fonctionnement de l'hypophyse risque en effet de fausser les conclusions du fait de l'addition des produits de la secrétion aux produits à doser.

Nous retrouvons alors dans tous les cas une action FSH + LH. Il est à noter que le choix d'animaux trop jeunes (moins de 20 jours) présente certains dangers. Si leur hypophyse secrète moins d'hormones, les récepteurs de l'action hormonale peuvent aussi ne pas réagir ou ne répondre que partiellement à l'hormone injectée.

## IV - DOSAGES BIOLOGIQUES DE FSH et DE LH

Les méthodes biologiques mises au point pour doser les gonadotropines résultent des propriétés que nous venons d'exposer. Parmi celles généralement utilisées chez le rat nous citerons (3) :

### 1/ Pour le dosage de la FSH

- Une méthode histologique due à EVANS et Coll. (41). Cette méthode est basée sur la mesure de l'augmentation de la taille des follicules ovariens, par injection de FSH, chez la ratte impubère hypophysectomisée.

- Une méthode basée sur l'accroissement de poids des testicules du rat mâle hypophysectomisé, accroissement qui est fonction de la quantité de FSH injectée.

- Une méthode pondérale utilisant la synergie des actions de la FSH à doser et d'une quantité constante de gonadotropine choriale humaine, sur les ovaires de rattes impubères. L'hormone choriale a une action de type LH. Elle accroit la réponse due à l'action de la FSH tout en éliminant les effets

d'une activité LH résiduelle possible dans le produit à doser. C'est la méthode de STEELMAN et POHLEY (129). (123).

• Enfin une méthode basée sur les mêmes propriétés a été également décrite par BROWN (17) sur la souris de souche Suisse Albino pesant 8 à 10 g. Les solutions de FSH à doser sont injectées, mélangées avec HCG, et les organes étudiés sont l'ovaire et l'utérus. Les poids de ces organes varieraient linéairement en fonction du logarithme de la dose de FSH injectée.

2/ **Pour le dosage de la LH**

• Une méthode histologique également due à EVANS et Coll. (41) et qui est basée sur la réparation des cellules interstitielles ovariennes chez la ratte hypophysectomisée.

• Deux méthodes pondérales qui résultent des travaux de GREEP (54). Elles consistent à mesurer l'accroissement de poids des vésicules séminales ou du lobe ventral de la prostate chez le rat mâle hypophysectomisé.

• Enfin une méthode due à PARLOW (103, 104), différente des méthodes qui précèdent. L'auteur utilise des rattes pseudogestantes chez lesquelles l'injection de LH provoque une déplétion de l'acide ascorbique ovarien, proportionnellement à la quantité du produit injecté. Cette méthode est très spécifique pour doser l'hormone lutéinisante même à l'état de traces.

Nous avons utilisé certaines des méthodes résumées ci-dessus. Nous en préciserons les détails techniques au chapitre de nos études expérimentales .

Citons enfin, pour mémoire, les dosages effectués sur les testicules du poussin de un jour ou sur les testicules du pigeon de 3 ou 4 semaines. WITSCHI (145, 146) a utilisé le tisserin dont les changements de couleurs du plumage seraient liés à l'activité hypophysaire, même chez le mâle castré. Cette méthode a l'avantage d'éliminer les relais de la gonade. Elle serait spécifique de l'activité LH.

Quelques tests sur les gonades des batraciens sont également possibles.

Enfin l'effet sur les ovaires de la lapine, animal à ponte provoquée, a été souvent retenu pour mettre en évidence une activité LH dans un produit injecté.

Ces différentes méthodes ont été résumées dans une étude due à R. HENRY (58).

## C - ORIGINE CYTOLOGIQUE DE LA FSH

Dès que l'origine hypophysaire des gonadotropines fut établie, il parut intéressant d'essayer de caractériser les cellules produisant ces hormones. Mais la complexité du problème était grande puisque l'antéhypophyse secrète plusieurs hormones et enzymes. Cependant, il fut admis très tôt, tout au moins chez le rat, que la FSH était produite par les cellules dites basophiles.

Nous ne voulons pas discuter ici la nomenclature des cellules hypophysaires. Cependant d'après les données histophysiologiques récentes rapportées en 1963 dans un colloque sous la direction de J. BENOIT et C. DA LAGE (11), et en 1964 par HERLANT (60) il apparait que les caractères morphologiques

et tinctoriaux des cellules à FSH ont été définis chez un grand nombre d'espèces de vertébrés. Selon la nomenclature proposée par HERLANT, après les travaux de ROMEIS (117), ces cellules correspondent aux cellules β ou basophiles des anciens auteurs.

Chez l'homme au contraire, il semble que les cellules β de ROMEIS n'ont pas de rapport avec la sécrétion de FSH.

Enfin, les cellules à FSH sont PAS-positives chez les vertébrés.

## D - METHODES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DE LA FSH

### I - REVUES GENERALES

De nombreuses revues concernant soit les gonadotropines, soit l'ensemble des hormones hypophysaires, ont été publiées. On peut citer à ce sujet, les articles de : U. WESTPHAL (143) en 1940, de LI et EVANS (77) en 1948, de C. H. LI (78) en 1949, de EVANS et SIMPSON (42) en 1950, de LI et HARRIS (81) en 1952, de COWIE et FOLLEY (29), de HAYS et STEELMAN (57), de WERTH (142) ou de DICZFALUZY et HEINRICHS (31) en 1955 ou de ALBERT (2) ou R. COURRIER (25) en 1961.

D'autre part, des chapitres ont été consacrés aux gonadotropines dans différents livres que nous mentionnons en référence (122, 65, 61).

Nous étudions ci-dessous, quelques travaux qui nous ont guidés dans le début de notre étude.

### II - CAS DES HYPOPHYSES DE MOUTON

Nous avons classé les méthodes de préparation de la FSH suivant les espèces dont les glandes provenaient. STEELMAN (136) pense en effet qu'il n'est pas possible d'appliquer systématiquement une méthode étudiée sur les hypophyses d'une espèce aux hypophyses d'une autre espèce quelconque (animale ou humaine).

Les premiers essais systématiques de fractionnement des hormones hypophysaires sont dus, comme nous l'avons vu, au groupe de FEVOLD et Coll. Ces travaux ont été publiés entre 1931 et 1943 (43, 44, 45, 46). Parmi leurs résultats nous retiendrons ceux qui sont encore valables de nos jours. En ce qui concerne les conditions d'extraction, ces auteurs montrent qu'un pH basique est favorable à un rendement élevé en FSH. Ils emploient la baryte, l'ammoniaque ou la pyridine à 2 %. Nous avons retrouvé que ce pH basique est favorable à une bonne extraction. Au stade des fractionnements au sulfate d'ammonium le Tableau I indique que la FSH est la plus soluble des hormones hypophysaires et qu'elle ne peut être précipitée qu'à partir de la concentration 2,4 M en ce sel à pH 7.

Deux remarques importantes sont également faites par ces auteurs :

1/ Il n'a pas été possible de découvrir un pH, une concentration donnée ou un solvant capable de faire une séparation totale de FSH et de LH par différence solubilité.

Tableau I

Précipitation fractionnée des hormones antéhypophysaires par des solutions de sulfate d'ammonium à pH 6,5 à 7,0 (pour ACTH à pH 5,4), d'après FEVOLD et coll. (46)

- La concentration en protéine est de 1 % au départ,
- L'activité biologique est exprimée en unités définies par les auteurs :

RU = rat unit ; CU = chick unit.

| Concentration en $(NH_4)_2SO_4$, M. | ACTH RU/Kg | GH RU/Kg | LH RU/Kg | TSH CU/Kg | FSH RU/Kg |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,25 pH 5,4 | 5 000 | | | | |
| 1,4 pH 7,0 | | 25 000 | 2 000 | | |
| 1,6 | | 64 000 | 4 000 | | |
| 1,8 | | Traces | 4 000 | 300 | |
| 2,0 | | | 4 000 | 350 | |
| 2,2 | | | 1 000 | 1 500 | |
| 2,4 | | | 500 | Traces | Traces |
| 2,6 | | | Traces | | 1 000 |
| 2,8 | | | | | 2 000 |
| 3,8 | | | | | |

2/ Aucun agent chimique n'a été trouvé pour réaliser cette séparation.

A la même époque, WALLEN-LAWRENCE (139) (1934) étudie la solubilité des deux gonadotropines dans des solutions aqueuses d'éthanol. Il constate qu'une séparation partielle des deux activités est possible avec 40 % d'éthanol. La LH est peu soluble dans cette solution, tandis que la FSH est plus soluble. Cependant, chaque hormone reste contaminée par l'autre. Cette solution d'éthanol à 40 % sera fréquemment utilisée néanmoins comme point de départ des méthodes de purification de la FSH. Une étude de ce fractionnement nous a montré que la séparation des deux hormones est mauvaise, à ce stade, et nous l'avons abandonnée.

Dans le cas par exemple, de la méthode de préparation de JENSEN et Coll. (64) en 1939, l'extraction des hypophyses est faite par l'éthanol à 40 %. Les auteurs font ensuite une remarque, que nous pensons importante, au sujet des conditions expérimentales à employer pour les précipitations au sulfate d'ammonium. Il faut en effet, additionner le sel très lentement et laisser ensuite le précipité qui s'est formé, évoluer pendant une nuit avant de séparer l'insoluble du surnageant. Nous verrons que ce temps d'évolution des précipités est indispensable.

Un autre travail est à signaler pendant cette période. Il est dû à McSHAN et MEYER (92) en 1939. Ces auteurs ont remarqué que la FSH n'était pas détruite par la trypsine alors que la LH l'était ; ce qui était confirmé l'année suivante, par CHEN et VAN DYKE (20). McSHAN et MEYER avaient alors

pensé obtenir la FSH pure par destruction de LH grâce à l'action de la trypsine. A la fin de la digestion enzymatique, la trypsine est détruite par chauffage à 75°C pendant 20 minutes et les auteurs disent ne pas avoir de perte de FSH malgré ces conditions "drastiques".

Ce traitement à 75°C pourrait cependant détruire une partie de l'activité FSH, car LI (84) a montré que cette hormone était détruite après un chauffage d'une heure à 60°C.

Enfin, FRAENKEL-CONRAT et Coll (47, 48) en 1940, obtiennent une FSH d'activité biologique très élevée, en associant les différentes méthodes connues à l'époque. L'extraction des glandes est effectuée par l'alcool à 40 %, puis une précipitation de la FSH est faite à pH 4,5 par addition d'acétone jusqu'à 50 %. L'activité est ensuite extraite de ce précipité par une solution de chlorure de sodium à 1 %. La solution de FSH ainsi obtenue, est additionnée de sulfate d'ammonium jusqu'à 50 % de saturation. Un insoluble est écarté. La FSH est précipitée dans la solution par augmentation de la concentration saline jusqu'à 67 % de saturation. Cette opération de fractionnement par le sulfate d'ammonium peut être répétée plusieurs fois dans les mêmes conditions. La purification est complétée par des fractionnements à l'acétone et à l'éthanol.

Ces auteurs ont ainsi obtenu une préparation de FSH hautement active (environ 55 fois l'étalon ARMOUR) et de nombreuses préparations décrites ensuite n'ont pas permis d'atteindre une telle purification.

En 1949, on peut signaler un travail de LI et Coll (79). La méthode se résume à :

- Une extraction à partir des glandes congelées, par une solution de chaux, suivie d'une neutralisation partielle par barbottage de $CO_2$ ;

- Un fractionnement par le sulfate d'ammonium entre les concentrations 2,0 M et 3,0 M à pH 4,7 ;

- Un fractionnement par l'éthanol à 40 % en présence de phosphate de potassium (un résidu est écarté) ;

Enfin, un nouveau fractionnement par le sulfate d'ammonium entre 2,0 M et 3,0 M.

La FSH obtenue n'est cependant pas très active (activité équivalente à à celle de l'étalon ARMOUR).

KOENIG et KING (73) publient en 1950, une méthode rapide et simple qui permet d'obtenir un mélange de FSH et de LH dans une même fraction, avec élimination de la prolactine : la poudre acétonique d'hypophyses de mouton est extraite par une solution d'éthanol à 40 % contenant un tampon acétate à pH 4,50. La concentration d'alcool est portée à 80 % : la fraction insoluble qui se forme contient FSH + LH, tandis que le surnageant contient la prolactine qui peut être récupérée dans cette solution par addition d'acétone. Ce procédé est souvent le point de départ de la préparation dans ces 3 hormones.

De 1954 à 1956 se placent plusieurs travaux de McSHAN, MEYER et Coll. (93, 94, 75). Ces auteurs utilisent des procédés différents. D'abord l'extraction est réalisée à 68°C pendant une heure et en solution saturée de chlorure de sodium. Ensuite, une nouvelle méthode est employée pour concentrer l'activité FSH. Celle ci est adsorbée sur une résine échangeuse de cations, l'Amberlite IRC 50 (XE 97), par agitation de la résine dans la solution. L'Amberlite est séparée par décantation et la FSH en est éluée par un faible volume de solution d'acétate de sodium à 3,72 %.

Malheureusement, il est difficile de comparer l'activité de la FSH obtenue par ce procédé avec celle préparée par d'autres laboratoires.

Cependant, tous ces procédés, même répétés plusieurs fois, ne permettaient pas de purifier au delà de certaines limites. C'est alors que l'introduction de techniques nouvelles telles que la chromatographie ou l'électrophorèse de zone permettront (à partir de cette époque) de faire de nouveaux progrès.

Un premier travail utilisant ces techniques, est dû à ELLIS (36, 37) en 1958. Les principaux stades sont les suivants :

- Extraction par le sulfate d'ammonium 0,1 M à pH 7,4 pendant vingt heures. L'extrait est additionné d'acide chlorhydrique 2 N jusqu'à pH 5,5 et l'insoluble formé éliminé.

- Fractionnement par le sulfate d'ammonium à pH 7,5. Une fraction insoluble à la concentration 2,2 M en ce sel est éliminée et la FSH est précipitée entre les concentrations 2,2 M et 3,0 M.

- Fractionnement par le sulfate d'ammonium à pH 4 : le résidu de FSH qui vient d'être obtenu est remis en solution. La fraction qui précipite à nouveau à la concentration 2,0 M est écartée. La FSH est récupérée entre 2,0 M et 3,0 M

- Fractionnement par l'acide métaphosphorique et l'éthanol : la fraction FSH ci-dessus, est remise en solution aqueuse à une concentration de 1 % en protéine. Puis le pH est ajusté à 3,5 par l'acide métaphosphorique. Un insoluble est écarté tandis que la FSH est récupérée par addition d'éthanol jusqu'à 35 %.

- Chromatographie sur di-éthyl-amino-éthyl-cellulose (DEAE) (fig. 1) : la fraction protéique précédente est introduite sur la colonne équilibrée avec un tampon phosphate de sodium 0,0075 M à pH 6,9. L'élution est faite par des tampons phosphates à des concentrations croissantes. L'activité de la FSH ainsi obtenue, est vingt fois plus grande que celle de l'étalon ARMOUR.

- Electrophorèse de zone sur amidon dans un tampon acétate de sodium, pH 4 (voir fig. 2) : toute l'activité est comprise dans une fraction qui correspond à 42 % de la protéine introduite (30 à 40 fois celle de l'étalon ARMOUR). L'ensemble du procédé permet une amélioration de la pureté de la FSH. Nous verrons p. 120 que ce procédé permet d'avoir une FSH moyennement active avec un bon rendement. On retrouve alors une activité biologique comparable à celle obtenue par FRAENKEL-CONRAT dès 1940. Nous avons repris la chromatographie sur DEAE-cellulose dans notre procédé, en éliminant toutefois le tampon phosphate qui peut donner des complexes.

La même année 1958, RAACKE, LOSTROH et LI (113) étudient, par électrophorèse de zone sur amidon, le comportement de la FSH de mouton obtenue suivant le procédé décrit en 1949 (79). Les conditions sont les suivantes : l'amidon est équilibré par un tampon borate à pH 8,5. L'électrophorèse dure entre 48 et 72 heures. Puis le support est fractionné en tranches d'où la protéine est extraite par l'eau et étudiée par colorimétrie. La migration se fait vers l'anode. La purification est de 10 fois, mais le rendement qui semble faible n'est pas donné.

Une nouvelle électrophorèse dans un tampon borate à pH 7,9 révèle une bonne coïncidence entre le pic de protéine et le pic d'activité, bien que celle-ci soit faible.

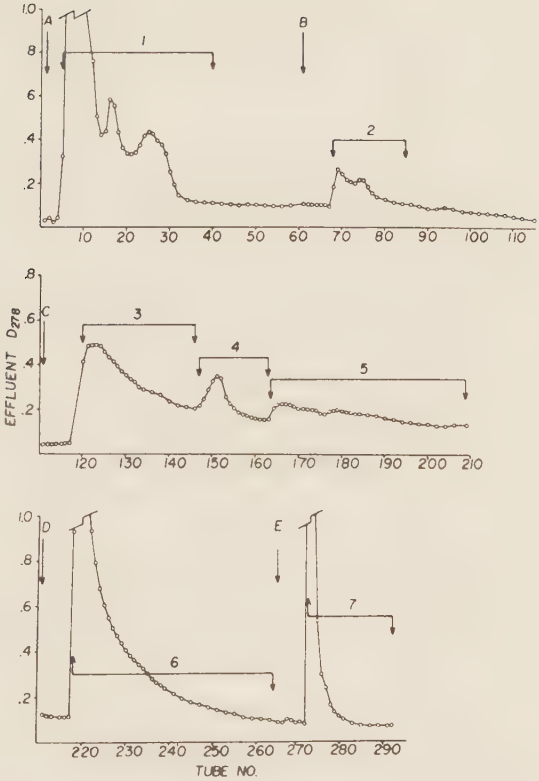



Fig. 1 - Chromatographie de la FSH de mouton sur DEAE-cellulose tamponnée à pH 6,9 par un tampon 0,0075 M $Na_2HPO_4$ 0,0075 M $NaH_2PO_4$.
A : Elution par une solution 0,0075 M $Na_2HPO_4$.
B : Elution par une solution 0,025 M $Na_2HPO_4$.
C : Elution par une solution 0,06 M $Na_2HPO_4$.
D : Elution par une solution 0,1 M $K_2HPO_4$.
E : Elution par une solution 0,3 M $K_2HPO_4$.
D'après Ellis (36).

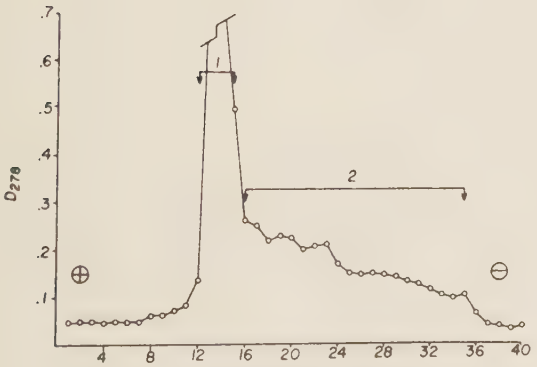



Fig. 2 - Electrophorèse de zone sur amidon de la fraction 3 de la figure 1. D'après Ellis (36).

Les auteurs font alors remarquer que les différentes fractions inactives isolées dans la première électrophorèse, ont des pH isoélectriques pratiquement égaux à celui de la FSH, ce qui rend leur élimination difficile. Nous verrons dans notre étude que c'est peut-être là le résultat d'une dénaturation de la FSH.

Nous citerons aussi un article de WARD et Coll. (140). Les auteurs utilisent la chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose (CMC) pour purifier l'hormone lutéinisante. L'extraction des gonadotropines des glandes de mouton est faite par la méthode de KOENIG et KING. Puis l'extrait est soumis à une chromatographie sur CMC dans un tampon phosphate, à pH 6. Les auteurs signalent que la FSH n'est pas retenue par le support, dans ces conditions.

Dans un autre travail WOODS et SIMPSON, en 1959-1960 (148, 149) parviennent à une fraction de FSH dont l'activité est plus forte que celle des autres préparations connues à cette époque.

L'extraction est faite à partir de la poudre acétonique d'hypophyses, par une solution d'éthanol à 40 %, mais à la température de 25 ou 27°C.

Le pH est ensuite abaissé à une valeur de 4,0 à 4,8. La fraction soluble est conservée et l'activité précipitée dans cette solution par l'acétone à la concentration de 60 % à pH 5,2.

Ce précipité est extrait par une solution de chlorure de sodium 0,2 M à pH 6,5 à 7,0. Une fraction insoluble à la concentration de 2,0 M en sulfate d'ammonium est éliminée, l'activité FSH étant récupérée par précipitation à la concentration 3,0 M en ce sel. Ce dernier fractionnement est répété trois fois dans les mêmes conditions.

Enfin la FSH ainsi obtenue, est chromatographiée sur DEAE-cellulose équilibrée par un tampon phosphate 0,005 M à pH 7,0. L'élution des protéines adsorbées est faite par des tampons de concentration croissante. La FSH est éluée à la concentration de 0,06 M. L'activité spécifique est 65 fois plus grande que celle de l'étalon ARMOUR.

Le dernier travail à mentionner sur la FSH de mouton est dû à REICHERT et PARLOW (114) en 1963. Les auteurs insistent sur le fait que s'ils obtiennent un produit peu actif en FSH (activité égale à celle de l'étalon FSH-NIH-$S_1$) ce produit est très purifié biologiquement, car l'activité LH qui le contamine est la plus faible obtenue jusqu'à ce jour.

Ce procédé comprend les stades suivants :

- Extraction des glandes fraîches par l'eau distillée à pH 5,5.

- Fractionnement de cet extrait par le sulfate d'ammonium : un résidu est écarté à la concentration 2,0 M pH 7. La FSH est recueillie en élevant la concentration du sel à 3,0 M pH 4 ; puis le résidu obtenu est repris par l'eau, neutralisé, dialysé et lyophilisé.

- Extraction de cette fraction lyophilisée, par l'eau à pH 5,5 pendant 4 heures.

- Addition de sulfate d'ammonium : jusqu'à la concentration de 2,2 M, ce qui permet d'écarter un insoluble inactif.

- Addition d'acide chlorhydrique jusqu'à pH 4 dans le surnageant obtenu au stade précédent. Une fraction insoluble appelée FSH 1, est isolée, tandis que la solution restante est additionnée de sulfate d'ammonium jusqu'à une

concentration de 3,2 M à pH 7, qui permet d'isoler une seconde fraction à activité FSH. Ces deux fractions ont des activités FSH équivalentes.

Nous avons observé aussi qu'une partie de la FSH devenait insoluble dans ces conditions de pH (voir page 34), ce qui s'explique si l'on considère que le pH isoélectrique de la FSH est de 4,4.

## III - CAS DES HYPOPHYSES DE PORC ET DE CHEVAL

Les hormones gonadotropes extraites des hypophyses de porc, ont été également étudiées depuis longtemps. Nous pouvons citer à ce sujet GREEP et Coll. (53) en 1940 et VAN DYKE et Coll. (35) qui, dès 1950, rapportent l'obtention par électrophorèse d'une fraction FSH à 85 % de pureté. Ces derniers auteurs comparent les FSH de mouton et de porc obtenues respectivement par C. H. LI en 1949 et par eux-mêmes au cours de ce travail.

Ils étudient particulièrement différents stades comme par exemple le fractionnement par le sulfate d'ammonium ou par l'éthanol de la protéine en solution dans l'acétate de sodium (pH 4 à 5,40) ou le véronal (pH 8,43 à 8,60). Ils cherchent également à éliminer les lipides.

Enfin, ils décrivent des procédés nouveaux de fractionnement par le sulfate de sodium, par les acides nucléiques ou par précipitation au point isoélectrique. Nous trouvons également dans ce mémoire, une première étude immunologique intéressante où sont comparées ces FSH de mouton et de porc. De ces études, il ne ressort que quelques petites différences existant entre ces deux FSH d'origine dissemblable.

Mais les travaux les plus importants ont été effectués par STEELMAN et Coll. de 1953 à 1959.

Ces auteurs utilisent des méthodes classiques. En 1953 (130) leur schéma de préparation est le suivant :

- Une extraction à pH basique,
- Un fractionnement de l'extrait par l'éthanol à 40 % dans le phosphate de sodium. Un insoluble est écarté. L'activité FSH est récupérée dans la solution à 75 % d'éthanol.
- Enfin, un fractionnement par le sulfate d'ammonium est réalisé sur la FSH obtenue au stade précédent. Les limites de concentration sont les mêmes que pour les hypophyses de mouton.

En 1955, STEELMAN (131) emploie la pancréatine pour diminuer l'activité LH, cette dernière, nous l'avons vu, ne résistant pas à la digestion par la trypsine. Le produit obtenu est 11 fois plus actif que l'étalon ARMOUR de FSH.

Puis, après avoir utilisé successivement, en 1956 et 1958, deux techniques nouvelles : la chromatographie sur DEAE-cellulose (132, 133) et la chromatographie sur hydroxyl-apatite (134), STEELMAN et Coll. donnent les deux schémas suivants de préparations, en 1959 (136).

### 1/ Schéma de préparation avec digestion enzymatique

- Premier stade : extraction des glandes à pH basique,

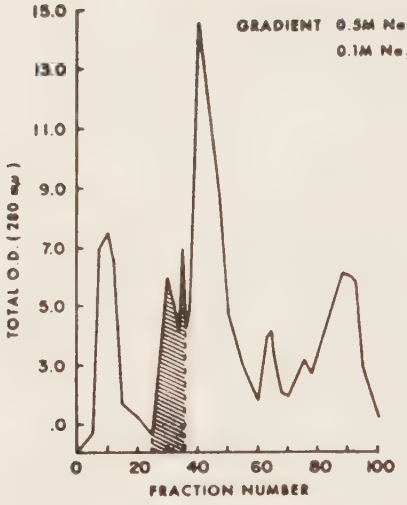



Fig. 3

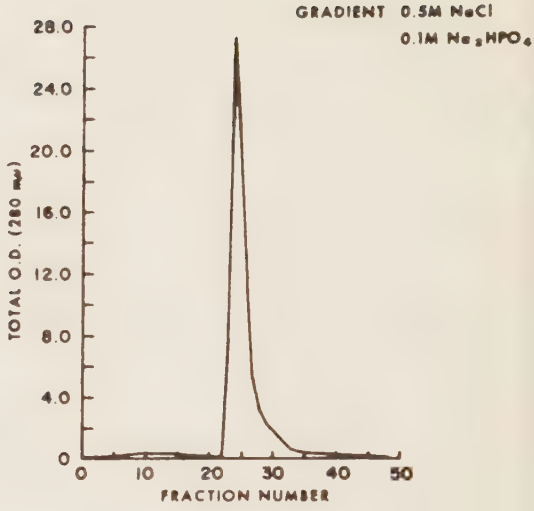



Fig. 4

Fig. 3 - Chromatographie de la FSH après digestion enzymatique (pancréatine) sur DEAE-cellulose. D'après Steelman et coll. (136).

Fig. 4 - Rechromatographie de la FSH sur DEAE-cellulose (protéine à activité FSH isolée dans la partie hachurée de la figure 4). D'après Steelman et coll. (136).

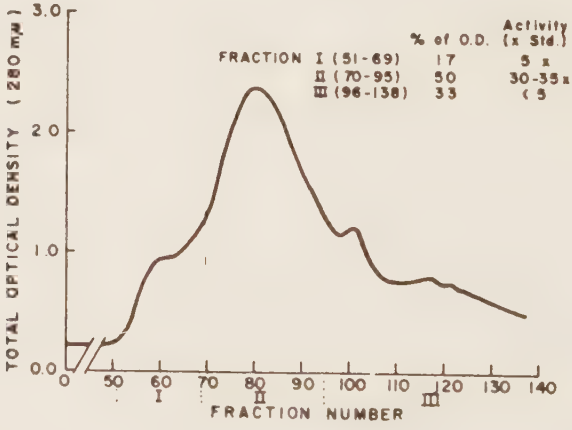



Fig. 5 - Rechromatographie de la FSH n'ayant pas subi de digestion enzymatique. Colonne de DEAE-cellulose. D'après Steelman et coll. (136).

• Deuxième stade : fractionnement de l'extrait par le sulfate d'ammonium aux concentrations 2,0 M et 3,0 M, la FSH étant récupérée entre ces deux valeurs. C'est la préparation décrite par VAN DYKE en 1950.

• Troisième stade : la FSH obtenue ci-dessus est soumise à une digestion enzymatique par la pancréatine. Une précipitation par l'éthanol permet de récupérer la FSH après digestion.

• Quatrième stade : chromatographie sur DEAE-cellulose où la protéine est retenue. L'élution se fait par augmentation de la concentration en chlorure de sodium, dans le tampon phosphate disodique (voir fig. 3). La partie hachurée correspond à l'élution de la FSH.

Une nouvelle chromatographie de cette fraction active ne donne qu'un seul pic (fig. 4). D'autres études confirment l'homogénéité de cette FSH. L'activité biologique est alors 30 à 40 fois plus forte que celle de l'étalon ARMOUR.

2/ **Schéma de préparation sans digestion enzymatique**

Si les auteurs suppriment le troisième stade en soumettant directement la fraction FSH obtenue au second stade, à une chromatographie sur DEAE-cellulose dans les mêmes conditions que ci-dessus, ils obtiennent alors une FSH moins purifiée. Une nouvelle chromatographie de cettre fraction sur DEAE-cellulose montre (fig. 5) que ce produit est hétérogène. D'autres études confirment d'ailleurs cette conclusion. L'activité biologique est cependant du même ordre de grandeur que précédemment.

Ainsi donc, la digestion par la trypsine modifie profondément le résultat de la chromatographie sur DEAE-cellulose.

Comme autre travail effectué sur des hypophyses animales, il nous faut citer aussi l'étude des gonadotropines de cheval par SAXENA, McSHAN et MEYER (120) en 1962. C'est la seule étude de ces glandes après celle effectuée par HALEY en 1950 (56).

Les glandes fraîches sont extraites 6 fois par une solution d'éthanol à 40 %. Puis l'activité FSH est précipitée par augmentation de la concentration d'alcool jusqu'à 85 %. Le résidu isolé est réextrait 7 fois par l'eau à pH 5, neutralisé à pH 7 et lyophilisé.

Cette fraction est soumise à l'électrophorèse de zone sur cellulose éthanolisée, équilibrée à pH 7,7 dans un tampon phosphate de concentration 0,037 M. Enfin des électrophorèses sur gel d'amidon prouvent que la fraction active recueillie, est encore très hétérogène.

Nos essais d'électrophorèses semblent indiquer que cette technique dénature la FSH. Par conséquent les hétérogénéités peuvent n'apparaitre qu'au cours de l'expérience.

L'activité biologique maximum obtenue est environ 7 fois celle de l'étalon FSH-NIH-$S_1$. Les auteurs signalent par contre, des dénaturations par l'emploi de solutions-tampon trop diluées.

## IV - CAS DES HYPOPHYSES HUMAINES

L'étude des gonadotropines hypophysaires d'origine humaine n'a été entreprise que très tardivement et les premiers travaux datent de 1958-1959 .

Citons d'abord un article de C. H. LI (82).

La préparation de la FSH comprend :

- L'extraction de la poudre lyophilisée d'hypophyses par une solution de chaux à pH 10, 5.

- Deux fractionnements par le sulfate d'ammonium, la FSH étant récupérée entre les concentrations de 1, 9 M et 3, 0 M en ce sel.

- Une chromatographie sur Amberlite IRC50 à pH 5, 1. La FSH n'est pas adsorbée dans ces conditions ; elle est donc récupérée dans le premier pic sortant de la colonne.

Le comportement de cette FSH a été étudié à nouveau en 1960 par chromatographie sur DEAE-cellulose et par électrophorèse de zone. Par électrophorèse sur amidon ou sur cellulose éthanolisée à pH 8, 4 dans le tampon véronal, la FSH migre vers le pôle positif. Le rendement n'atteint pas 50 %. (83).

STEELMAN et Coll. (135) en 1959 ont également travaillé sur les hypophyses humaines. Leur méthode de préparation des gonadotropines est la suivante :

**Premier stade** : La méthode de KOENIG et KING est appliquée aux hypophyses. L'activité FSH obtenue est 8 à 10 fois celle de l'étalon ARMOUR.

**Deuxième stade** : Chromatographie sur carboxyméthylcellulose : la protéine est introduite sur la colonne équilibrée à pH 6, 1 par un tampon acétate d'ammonium. Une fraction (Fraction A voir fig. 6) n'est pas retenue dans ces conditions. Elle contient toute l'activité FSH.

**Troisième stade** : Chromatographie sur DEAE-cellulose : Cette fraction A est reprise sur DEAE-cellulose équilibrée à pH 7 par de l'acétate d'ammonium 0, 01 M (fig. 7). La totalité des protéines est retenue sur la colonne . L'élution est effectuée par un gradient obtenu avec un tampon acétate d'ammonium 0, 75 M. Seule la fraction A de ce chromatogramme est active.

L'activité atteinte est 50 fois celle de l'étalon FSH ARMOUR.

Nous citerons enfin quelques travaux publiés depuis 1960 dans lesquels des techniques nouvelles sont décrites.

ROOS et GEMZELL (118) en 1960, utilisent pour purifier la FSH humaine : la chromatographie sur CM-cellulose et sur DEAE-cellulose, ainsi que l'électrophorèse de zone sur chlorure et acétate de polyvinyle.

BUTT et Coll. (18) en 1961, après des extractions effectuées sur la poudre acétonique d'hypophyses et des fractionnements par l'éthanol, utilisent également la CM-cellulose, la DEAE-cellulose et une chromatographie sur le phosphate de calcium.

BETTENDORF et Coll. (12) en 1962, commencent leur purification par le procédé de KOENIG et KING légèrement modifié. Puis ils continuent la purification de la FSH en utilisant la CM-cellulose, le gel Sephadex, le DEAE-Sephadex et l'électrophorèse de zone en continu. Aucun de ces procédés d'aile ne se révèle satisfaisant pour ces auteurs.

Enfin, nous citerons un dernier travail sur les hypophyses humaines, de REICHERT et PARLOW en 1964 (115).

Le procédé de purification après extraction et fractionnement au sulfate d'ammonium, ne fait appel qu'à la chromatographie sur DEAE-cellulose équi-

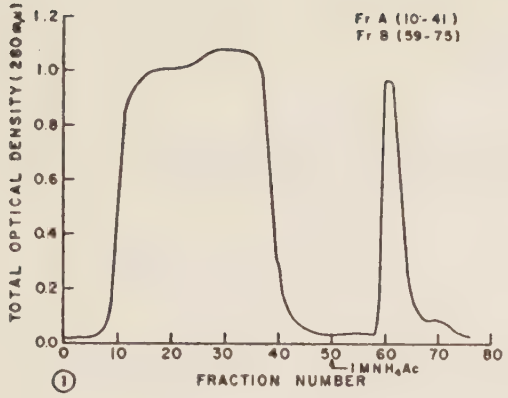



Fig. 6

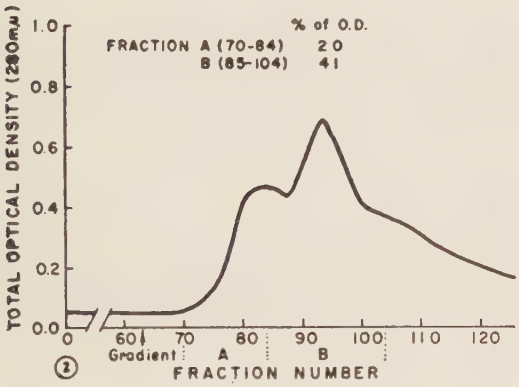



Fig. 7

Fig. 6 - Chromatographie de la FSH humaine sur C. M. -cellulose. D'après Steelman et coll. (135).

Fig. 7 - Chromatographie de la fraction A (voir ci-dessus) sur DEAE-cellulose. D'après Steelman et coll. (135).

librée à pH 8,0 par un tampon phosphate-borate de sodium. L'élution se fait par augmentation de la concentration saline des tampons grâce à l'addition de chlorure de sodium. La FSH obtenue présente une activité 53 fois plus élevée que celle de l'étalon FSH ARMOUR.

Il est à noter que pour apprécier les rapports d'activité, il faut tenir compte du fait que l'étalon NIH-FSH-$S_1$ est issu du mouton. En effet les FSH de porc, de mouton, de cheval, ou humaines, ont probablement, à stade de purification égal des effets plus ou moins grands dans le dosage de STEELMAN et POHLEY sur le rat. En d'autres termes, une activité de 50 fois l'étalon pour une FSH humaine, ne signifie pas que le produit est plus purifié qu'une FSH de mouton à 30 unités par mg, ou une FSH de cheval à 7 unités par mg.

## E - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

### I - CONSTANTES PHYSIQUES

L'étude des constantes physiques a surtout été effectuée entre 1940 et 1955. Les auteurs pensaient à ce moment, avoir obtenu la FSH pure. Puis, par suite de l'amélioration des techniques de purification, il a été possible de continuer à fractionner les produits préparés à cette époque, prouvant ainsi leur hétérogénéité.

Depuis, les auteurs se sont attachés surtout à l'amélioration de l'activité biologique, tout en recherchant l'homogénéité du produit isolé par toutes les techniques modernes.

C'est ainsi qu'en 1955, le poids moléculaire admis pour la FSH était de 67 000 à 70 000 d'après LI (84). Puis en 1959, STEELMAN (136) donne le chiffre de 25 000 à 30 000 pour toutes les FSH, quelle que soit l'origine des glandes.

Le point isoélectrique, également, avait été déterminé. Il était de 4,5 d'après LI (84). Pour la FSH de porc obtenue par STEELMAN après digestion enzymatique, ce pHi serait de 5,1 à 5,2. La constante de sédimentation de même a été donnée par LI (84) et serait de 4,70 S.

### II - COMPOSITION CHIMIQUE

Aucun auteur à notre connaissance, n'a donné de composition pour la FSH de mouton. Nous ne trouvons que les données concernant la composition de la FSH de porc établie par STEELMAN et SEGALOFF (136) en 1959 (voir Tableau II).

### III - STABILITE

STEELMAN et SEGALOFF (136) signalent dès 1959 que plus la FSH de porc est purifiée, moins elle est stable. A l'état lyophilisé, la perte d'activité peut atteindre les deux tiers en trois mois. Ces auteurs constatent par contre qu'après le traitement à la trypsine la FSH obtenue est stable. Pour ces auteurs également, le versène, agent complexant des métaux, conduit à une perte d'activité pouvant atteindre les 4/5 de la valeur d'origine.

L'action du cétène, agent d'acétylation des fonctions aminées, a été étudiée par LI (142) en 1940 sur la FSH de mouton. L'activité est également diminuée.

La cystéine, étudiée par FRAENKEL CONRAT et Coll. réduit l'activité FSH d'environ 40 fois. (142).

L'influence du pH a été étudiée dès 1950 sur la FSH de porc par VAN DYKE et Coll. (35). A pH 1,0 disent ces auteurs, la FSH est rapidement détruite même à température ordinaire. Par contre, elle serait stable entre pH 3,15 et 10,9. Elle serait également stable après six heures à pH 4 (tampon acétate).

La résistance à la chaleur a été recherchée sur la FSH de mouton par LI (84). D'après cet auteur, le destruction serait totale à 31°C en milieu

acide chlorhydrique 0,01 M après trente minutes ; au-dessus de 60°C la FSH serait détruite rapidement. Cette dernière étude est à rapprocher de la méthode d'extraction utilisée par McSHAN et Coll. (voir p. 13) où la FSH est traitée pendant une heure à 68°C.

Tableau II

Amino acides et glucides contenus dans la FSH de porc (après digestion par la pancréatine). D'après STEELMAN (136).

| Amino acides (%) | | Glucides (%) | |
|---|---|---|---|
| Acide aspartique | 11,6 | Galactose | 1,2 |
| Acide glutamique | 9,2 | Mannose | 1,4 |
| Sérine | 4,4 | Fucose | 1,1 |
| Glycocolle | 2,9 | | |
| Thréonine | 5,4 | Hexosamines | 3,7 |
| Alanine | 3,5 | | 7,4 |
| Lysine | 5,7 | | |
| Arginine | 3,6 | | |
| Proline | 4,4 | | |
| Tyrosine | 4,5 | | |
| Valine | 3,9 | | |
| Méthionine | 1,5 | | |
| Isoleucine | 2,8 | | |
| Leucine | 4,0 | | |
| Phenylalanine | 3,3 | | |
| Histidine | 2,8 | | |
| Cystine-cysteine | 6,5 | | |
| Tryptophane | 0,7 | | |
| | 80,7 | | |

Enfin, la FSH a été soumise à différentes digestions enzymatiques. Dès 1929, REISS et HAUROWITZ (116) ont commencé cette étude qui a été poursuivie par CHOW et Coll. (21) en 1939. Les enzymes suivantes ont été utilisées : la carboxypeptidase, la chymotrypsine, la trypsine, la papaïne et la pepsine. Ces digestions ont malheureusement été effectuées sur des extraits bruts ou peu purifiés, de sorte que les conclusions sur la stabilité de l'activité biologique sont difficiles à transposer sur les produits hautement purifiés d'aujourd'hui. Deux résultats sont cependant à retenir : la Trypsine Merck réduit légèrement l'activité FSH de porc après une hydrolyse allant de 61 à 75 %, tandis que l'activité LH est détruite. La pepsine détruit l'activité FSH en réduisant légèrement l'activité LH après une hydrolyse de 58 à

80 %. Au contraire, pour LI en 1950 (80) au cours d'une digestion par la pepsine allant jusqu'à 65 %, l'activité FSH n'est pas détruite.

## CHAPITRE II

# MÉTHODES DE DOSAGE BIOLOGIQUE

### A - ETALONS-UNITES FSH ET LH

Les étalons dont nous nous servons pour FSH et LH, proviennent de l'ENDOCRINOLOGY STUDY SECTION, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH" à BETHESDA, U. S. A.

Nous utilisons :

- pour FSH, la FSH. NIH. $S_1$
- pour LH, la LH. NIH. $S_1$ ou la LH. NIH. $S_3$.

**Unité**

Nous rattachons l'unité de FSH à l'étalon FSH. NIH. $S_1$ et nous admettons par définition qu'un mg de cette préparation contient une unité de FSH. L'unité de LH est définie de même à partir de l'étalon LH. NIH. $S_1$.

D'autres étalons sont également utilisés par différents laboratoires :

- pour FSH : un étalon ARMOUR (264 – 151 X)
- pour LH : un étalon ARMOUR (227 – 80)

Les équivalences entre tous ces étalons sont les suivantes :

- FSH.NIH.$S_1$ est environ 2,7 fois plus actif que l'étalon 264 – 151 X [voir (2) p. 375].
- LH. NIH. $S_1$ est 1,25 fois plus actif que LH. NIH. $S_3$.
- Enfin, la LH. NIH. $S_1$ et l'étalon ARMOUR (227 – 80) ont une activité LH équivalente [voir (2) p. 307 et 320].

### B - DOSAGE DE LA FSH - METHODE DE STEELMAN ET POHLEY (129)(*)

Comme nous l'avons vu page 10, cette méthode est fondée sur l'accroissement pondéral (augmentation assay) de l'ovaire de la ratte normale impubère

---

(*) Ces dosages ainsi que ceux réalisés sur la prostate ventrale ont été effectués sous la direction de Monsieur le Professeur COURRIER avec Madame COLONGE.

de 21 jours, après injection du produit à doser, associé à une quantité constante (de 20 à 40 UI) de gonadotropine choriale (HCG). Les doses totales de FSH et d'HCG sont réparties en six injections sous-cutanées faites à raison d'une injection le matin et une le soir, pendant trois jours. L'autopsie est pratiquée 24 heures après la dernière injection. Les ovaires sont isolés (l'oviducte est écarté) et pesés immédiatement après l'autopsie.

Pour les premiers stades de notre préparation, les résultats des dosages seront donnés en moyenne de poids des ovaires et non rapportés à l'étalon FSH. NIH. $S_1$, que nous ne possédions pas à l'époque.

**Animaux**

Nous avons toujours utilisé le rat, mais certains auteurs préfèrent la souris. Après avoir employé des rats de souche WISTAR pendant plusieurs années, nous préférons actuellement la souche de rats HOLTZMAN qui répond de façon plus régulière que la première aux injections de FSH. (rats de l'Elevage DUTERME à CONDE SUR HUISNE dans l'Orne).

**Zone des réponses linéaires**

STEELMAN et POHLEY ont démontré que l'accroissement de poids de l'ovaire est linéairement proportionnel au logarithme de la quantité de FSH injectée. On est donc conduit à injecter deux doses de l'étalon pour faire un étalonnage et deux doses de l'inconnue si l'on fait le dosage en 4 points.

Ce dosage n'est pas très sensible chez le rat. Il faut au minimum une dose totale de 75 µg de NIH. FSH. $S_1$ pour obtenir une réponse significative.

Pour le dosage en 4 points, nous utilisons un rapport de 2 soit 75 µg et 150 µg pour l'étalon, n et 2n pour la substance inconnue.

**Spécificité**

Ce dosage est considéré comme le plus spécifique pour doser FSH. La LH et les autres hormones hypophysaires en faible quantité, ne gênant pas. Par contre, si ces hormones hypophysaires sont présentes en forte proportion à côté de la FSH, ce qui est le cas dans les extraits bruts d'hypophyses, les résultats sont entachés d'une erreur par excès ou par défaut par suite des synergies ou des inhibitions qui agissent sur le poids des ovaires au-delà de l'action propre de la FSH.

**Analyse statistique** (*)

Une analyse de variance, suivie d'une analyse factorielle des effets des doses sont en général suffisantes pour avoir une idée de la précision du dosage.

Le rapport des activités entre le produit inconnu et l'étalon est calculé à partir de ces données suivant des relations fournies par BLISS (14) et par LISON (85).

---

(*) Les analyses statistiques dans la dernière phase de ce travail ont été faites à l'aide du computer électronique du COLLEGE DE FRANCE par M. G. VASSENT.

## C - DOSAGE DE LH

### I - METHODE DE PARLOW(*) : (104)

Cette méthode est fondée sur l'évaluation de la déplétion de l'acide ascorbique ovarien chez la ratte pseudogestante. Le procédé qui est utilisé au laboratoire est légèrement différent de celui indiqué par son auteur ; la modification que nous adoptons est due à PELLETIER (107).

La speudogestation est obtenue chez les rattes de 21 jours par une injection de 50 UI de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) suivie de deux injections de 25 UI d'HCG, chacune les 4ème et 5ème jour. Dix jours après le début du traitement, les échantillons à doser sont injectés dans la veine jugulaire gauche ; trois heures exactement après cette injection, un ovaire est prélevé, pesé et broyé dans l'acide métaphosphorique. On dose l'acide ascorbique dans cet extrait par colorimétrie au dichloroindophénol.

Un groupe témoin est traité par une solution de chlorure de sodium à 0,9 %.

**Animaux utilisés**

Les rats de souche WISTAR peuvent être utilisés. La sensibilité du dosage peut être augmentée en remplaçant cette souche par la souche HOLTZMAN.

**Doses**

Une dose de 0,4 µg de NIH. LH. $S_1$ donne en général une réponse significative chez le rat de souche HOLTZMAN ; ce dosage est ainsi le plus sensible de tous ceux décrits jusqu'à ce jour.

Pour un dosage en 4 points, la dose forte est obtenue en multipliant la dose faible par le facteur 4.

**Spécificité**

Cette méthode est considérée comme la plus spécifique pour le dosage de la LH. Seule, la vasopressine à forte dose peut donner également chez certaines souches de rats, une déplétion de l'acide ascorbique ovarien. On peut, grâce à cette méthode, doser la LH dans des extraits hypophysaires bruts et même dans une fraction où elle se trouve à l'état de traces comme impureté.

**Etude statistique des résultats**

Elle est ici plus compliquée que pour FSH. Elle consiste d'abord en une analyse de covariance utilisant la régression entre le poids des ovaires et la réponse au traitement. Sur les moyennes ajustées dans cette analyse ($\hat{Y}$) il est alors possible d'effectuer les comparaisons selon la méthode de DUNNETT, entre un groupe témoin (injecté de chlorure de sodium à 0,9 % par exemple) et les groupes qui correspondent aux traitements. Ces comparaisons permettent

---

(*) Deux dosages ont été faits par M. PELLETIER au CNRZ à JOUY-EN-JOSAS et les autres ont été réalisés au laboratoire avec l'aide de Mlle NOVELLA et de M. TALLON.

de juger si la différence entre le témoin et un traitement donné est significative. Si cette condition est réalisée, il est alors permis de faire une analyse en 4 points, comme pour FSH, sur les moyennes ajustées.

## II - METHODE DE GREEP ET COLL. : (54)

La principale méthode utilisée avant celle décrite ci-dessus, est due à GREEP et Coll. Elle est basée sur l'accroissement de poids des prostates ventrales sous l'action d'injection d'hormone lutéinisante chez le rat mâle hypophysectomisé.

Les conditions que nous avons utilisées sont les suivantes : les rats sont hypophysectomisés à 24 jours. Quatre jours après l'opération, les injections du produit à doser sont commencées. Elles sont faites pendant 4 jours à raison de deux injections sous-cutanées de 0,5 ml par jour, soit huit injections au total. L'autopsie est effectuée 24 heures après la dernière injection. Les prostates ventrales sont fixées pendant une nuit dans le liquide de Bouin avant d'être pesées.

**Animaux utilisés**

Nous n'avons utilisé au laboratoire que des animaux de souche WISTAR. Sur cette souche de rats nous n'avons pu trouver de réponses proportionnelles aux doses injectées dans les limites des concentrations de LH étudiées (2 à 16 µg), ce qui nous a conduit à abandonner ce dosage. Cependant, au cours d'injections de FSH faites à des rats mâles hypophysectomisés, en vue d'agir sur le poids des testicules et sur la spermatogénèse, nous avons toujours prélevé les prostates ventrales ainsi que les vésicules séminales, pour mettre en évidence une éventuelle action LH.

**Spécificité**

Cette méthode de dosage ne permettrait pas selon PARLOW (105) de doser des traces de LH dans une fraction à activité FSH prédominante. La FSH en effet, a, comme le montre cet auteur, une action sur le poids des prostates ventrales.

## D - DOSAGE DE TSH(*) : METHODE DE McKENZIE (91)

Cette méthode de dosage de la TSH a été transposée ici sur le rat. On injecte d'abord $^{131}I$ aux rats puis, quelques heures après, de la thyroxine afin de bloquer la TSH endogène. Le dosage consiste ensuite à mesurer l'augmentation de $^{131}I$ circulant dans le sang de l'animal, sous l'effet d'une injection de la solution de TSH à doser.

La sensibilité du dosage chez le rat, suivant la méthode utilisée au laboratoire, est de 1 à 5mU de TSH.

L'analyse statistique des résultats obtenus est faite de la même manière que pour LH, mais après transformation logarithmique (base 10) de

---

(*) Ce dosage de TSH a été fait au laboratoire par M. ZIZINE et Mme MONTEGUT.

toutes les données afin d'en "normaliser" les variances. L'analyse de covariance est effectuée en utilisant la corrélation entre la radioactivité de la prise de sang avant et après le traitement.

## CHAPITRE III

# ÉTUDE DES MÉTHODES DE PURIFICATION DE LA FSH

### A - PERIODE DE PRELEVEMENT DES HYPOPHYSES

Les hypophyses de mouton nous sont fournies par une maison qui les collecte dès l'abattage des animaux. Ces glandes sont immédiatement séparées de la post-hypophyse, congelées et livrées aussitôt.

Après plusieurs années de contrôle, nous avons mis en évidence une variation saisonnière importante dans le contenu en FSH des antéhypophyses de mouton.

La variation est annuelle avec un maximum d'activité en janvier et février et un minimum en juin et juillet. Par conséquent, nous récoltons les hypophyses à partir de novembre décembre et jusqu'en mars. Les préparations faites sur ces glandes ont alors un bon rendement en FSH. L'activité spécifique de l'hormone, obtenue à partir de ces glandes, est aussi la plus élevée. Signalons à ce sujet, que HUTCHINSON et Coll. (62) soutiennent au contraire que la proportion de FSH reste constante dans l'hypophyse de mouton au cours de l'année.

### B - POUDRE ACETONIQUE - POUDRE BUTANOLIQUE - CONSERVATION DES GLANDES

Actuellement, nous conservons les glandes sous forme congelées pendant plusieurs mois.

Il est également possible de les transformer en une poudre acétonique qui constitue la première étape de l'extraction de la FSH. Le traitement des tissus par l'acétone présente l'avantage de détruire des complexes lipido-protéiques qui peuvent gêner l'extraction des protéines.

Ce traitement à l'acétone est suivi d'un traitement par le butanol d'après la technique de MORTON (99). Le butanol complète l'action de l'acétone en détruisant les complexes lipido-protéiques qui auraient pu résister à l'action de l'acétone. Des précautions sont indispensables au cours de ce traitement qui doit se faire, comme celui à l'acétone, autour de - 10°C. Il faut aussi que le butanol soit pur (butanol de synthèse Melle) et qu'il soit parfaitement éliminé des tissus après le traitement. Nous verrons plus loin de quelle façon cette élimination peut se faire.

D'après des essais que nous avons faits récemment, il ressort que la quantité d'hormone extraite, (tout au moins pour la FSH) est plus grande en partant de la poudre acétonique, le rendement à partir des glandes fraîches étant nettement plus faible.

Nous avons effectué d'une manière parallèle, depuis les glandes fraîches jusqu'au produit Zn R80 (voir méthode de préparation p. 62) deux préparations de FSH. Après avoir mélangé d'une manière aussi complète que possible 2 kg d'hypophyses fraîches, nous avons fait :

- sur 1 kg de ces hypophyses, une préparation selon le schéma du Tableau XV.

- sur l'autre kg d'hypophyses, une extraction directe des glandes par le sulfate d'ammonium à la concentration 0,1 M et à pH 8, donc en supprimant seulement les traitements à l'acétone et au butanol.

Les résultats de ces deux préparations effectuées sur des glandes comparables en tous points sont donnés dans le Tableau III.

Au stade Zn R80 où nous avons comparé ces deux procédés, nous constatons une différence de rendement de l'ordre de 4 fois, en faveur de la préparation effectuée sur une poudre butanolique de glandes. La délipidation semble donc améliorer considérablement les conditions mêmes de l'extraction de la FSH.

## C - TECHNIQUES D'EXTRACTION ET METHODES DE FRACTIONNEMENT PRELIMINAIRES

Nous désirions mettre au point une méthode permettant d'extraire toutes les hormones présentes dans le tissu antéhypophysaire tout en nous fixant comme but principal la purification de la FSH.

Devant les nombreuses méthodes qui s'offraient à nous au début de ce travail, nous avons repris le problème au point de départ, c'est-à-dire à partir de l'extraction soit des glandes fraîches, soit des poudres acétoniques ou mieux butanoliques.

Différentes étapes de ces recherches ont été publiées au fur et à mesure (26, 79, 70, 71, 72).

Nous passerons en revue les détails étudiés :

### I - ESSAIS PRELIMINAIRES DES CONDITIONS D'EXTRACTION

#### 1/ Choix du pH

Deux types d'essais sont faits afin de déterminer le pH optimum d'extraction. Les glandes sont broyées dans un broyeur Virtis, puis l'activité est extraite par agitation pendant 30 minutes dans une solution soit d'acide acétique 0,1 N à pH 2,9, soit de bicarbonate de sodium 0,1 N à pH 7,4.

Ce premier extrait est recueilli par centrifugation, puis les glandes sont traitées à nouveau dans les mêmes conditions. Les surnageants sont réunis, neutralisés et dialysés pendant 24 heures.

Tableau III

Rendement en FSH obtenu en partant soit des hypophyses fraîches, soit de la poudre acétonique - butanolique.

- La préparation n° 1 est effectuée à partir d'un kg de glandes fraîches.
- La préparation n° 2 est effectuée à partir d'une poudre acétonique et butanolique obtenue par traitement d'un kg de glandes de même provenance que les précédents.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129)
Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Préparation | Rendement au stade Zn R80 en mg | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Activité totale (U) |
|---|---|---|---|
| Préparation n° 1 | 464 | 0,18 (0,13 - 0,28) | 84 |
| Préparation n° 2 | 722 | 0,45 (0,31 - 0,60) | 325 |

Le contrôle de l'activité biologique est fait sur les ovaires de la lapine. Ce test, peu spécifique pour la FSH, a été néanmoins utilisé tout au début de ce travail. On injecte 7,5 ml de solution dialysée en une fois, soit un équivalent de 0,75 g de tissu frais. Les ovaires sont examinés avant le traitement et les effets produits par l'extrait injecté sont étudiés 48 heures après l'injection.

Les résultats de ces observations ont été les suivants :

- L'extrait à pH 2,9 ne produit aucune réaction sur les ovaires.
- L'extrait à pH 7,5 provoque une réaction très forte.

Une extraction à pH basique est donc préférable au moins pour extraire les gonadotropines.

Deux autres essais sont alors réalisés dans cette zone de pH.

Le premier est effectué suivant une méthode décrite par SQUIRE et LI (127, 128) et consiste à extraire les gonadotropines à partir d'une poudre acétonique d'hypophyses par une solution de chlorure de sodium à 0,5 % et à pH 6,8.

Le second extrait est réalisé à pH 8 dans un tampon phosphate de concentration 0,04 M. Le Tableau IV donne les résultats des dosages effectués chez le rat, la quantité injectée étant ramenée dans les deux cas au poids d'hypophyses fraîches.

On constate d'après ce dosage, que l'extraction faite à pH 8 par le tampon phosphate donne un rendement en activité légèrement supérieur au double de celui obtenu par une extraction à pH 6,8. Ce sera donc ce pH qui sera adopté dans notre préparation.

2/ **Choix de la force ionique**

Nous venons de voir dans le Tableau IV qu'une solution de tampon phosphate à la concentration 0,04 M donnait un extrait possédant une bonne activité gonadotrope.

L'introduction ultérieure des fractionnements par le sulfate d'ammonium nous amena cependant à remplacer le tampon phosphate par du sulfate d'ammonium 0,1 M afin de réduire le nombre des ions à ajouter à la solution de protéine. Le pH 8 est alors atteint par addition d'ammoniaque diluée. Une solution de sulfate d ammonium 0,2 M donne alors satisfaction quant à l'extraction des gonadotropines. Mais d'après le Tableau I dû à FEVOLD, nous voyons que l'ACTH n'est pas soluble dans ce milieu. Si nous voulons extraire le plus grand nombre possible d'hormones, il faut donc utiliser un milieu de concentration plus faible. Aussi, nous avons préféré adopter une solution dont la force ionique était voisine de celle utilisée dans les expériences résumées dans le Tableau IV.

3/ **Choix du volume de la solution d'extraction**

La première méthode d'extraction que nous avons utilisée consistait à épuiser 220 g de poudre butanolique, soit l'équivalent de 1 kg d'hypophyses fraîches, d'abord par 3 000 ml de solution de sulfate d'ammonium 0,1 M pendant 5 ou 6 heures. Puis ce premier extrait isolé, le résidu était repris

Tableau IV

Etude des conditions d'extraction des antéhypophyses : influence du pH.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| Produit injecté | Dose totale injectée (ramenée au poids) (g) de glandes fraîches) | Nbre de Rats | Moyenne de poids des ovaires (*) en mg |
|---|---|---|---|
| Extrait par NaCl 0,08 M à pH 6,8 | 0,8 | 5 | 42,70 ± 5,05 |
| Extrait par tampon phosphate 0,04 M pH 8 | 0,4 | 4 | 49,40 ± 7,18 |
| Témoins (NaCl) | 0 | 5 | 29,25 ± 2,72 |

(*) Les moyennes de poids des ovaires sont données avec les erreurs-types Sm calculés par la relation :

$$Sm = \left( \left[ SX^2 - \frac{(SX)^2}{n} \right] \frac{1}{n(n-1)} \right)^{1/2}$$

par 1500 ml de la même solution pendant une nuit et les extraits réunis. Le rendement moyen au stade Zn R80 de préparations faites sur de tels extraits était de 637 mg.

Afin de ne pas augmenter les volumes à centrifuger au cours de préparations effectuées sur des quantités plus importantes de glandes, nous avons pensé traiter l'équivalent de 1,500 kg de glandes, fraîches par ces

mêmes quantités de solution de sulfate d'ammonium. Le rendement moyen en produit Zn R80 de ces dernières préparations a été alors de 750 mg soit 500 mg par kg de glandes fraîches au lieu de 637 mg dans le premier cas, l'activité spécifique restant la même.

On voit donc, d'après ces résultats, qu'un volume minimum de solution d'extraction est indispensable pour obtenir un bon rendement.

Nous avons recherché alors si un troisième extrait effectué sur les tissus traités d'après les conditions du début contenait encore de l'activité gonadotrope. Les dosages biologiques nous ont montré qu'il n'en était rien : la volume utilisé pour l'extraction était donc suffisant pour un passage total des gonadotropines dans la solution.

### 4/ Etude de l'extraction par une solution hydroalcoolique

Une étude de l'extraction de la poudre acétonique d'hypophyses par l'alcool à 40 % suivant la technique de LI (78) a également été faite. Le rendement en FSH étant mauvais, nous avons été amenés à étudier la solubilité de la FSH dans cette solution hydroalcoolique. Les résultats d'un tel fractionnement sont donnés dans le Tableau V. Nous remarquons ainsi que l'activité FSH se partage entre le surnageant et le résidu de cette solution à 40 % d'alcool ; ceci explique que le rendement d'une extraction par l'alcool soit mauvais. Ce procédé ne nous a donc pas paru utilisable.

Tableau V

Répartition de l'activité FSH entre le surnageant et l'insoluble au cours d'un fractionnement par l'éthanol à 40 %.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| Produit injecté | Dose totale injectée en mg | Nombre de Rats | Moyenne de poids des ovaires en mg avec erreur-type |
|---|---|---|---|
| Fraction soluble dans l'éthanol à 40 % | 10 | 3 | 67,06 ± 3,72 |
| Fraction insoluble dans l'éthanol à 40 % | 10 | 3 | 36,80 ± 3,86 |
| Témoins (NaCl) | 0 | 3 | 23,80 ± 1,89 |

## II - ETUDE DES CONDITIONS DE FRACTIONNEMENT

### 1er stade

#### Abaissement du pH

En abaissant le pH de nos solutions d'extraction par addition d'acide sulfurique (ion $SO_4^{2-}$ déjà présent) nous constatons qu'un insoluble commence à se former vers le pH 5,9 à 6,0.

La quantité d'insoluble augmente au fur et à mesure de l'addition d'acide. Un de ces fractionnements a été conduit jusqu'à pH 4, 9. On constate qu'à ce pH il y a précipitation d'une partie de la FSH, l'accroissement très faible de l'activité spécifique de la fraction FSH soluble à pH 4, 9 ne compensant pas la perte de poids totale entre les deux étapes.

D'autres fractionnements réalisés à pH 5 nous ont permis d'éliminer un résidu qui, injecté à forte dose (voir fraction RII Tableau XVI), n'a pas montré d'activité FSH. Cette précipitation à pH 5 est donc conservée dans notre procédé de préparation.

De nombreux auteurs ont utilisé ce procédé pour éliminer dans leurs extraits des fractions inactives en FSH voir ELLIS (36) ou SQUIRE et LI (127).

**2ème stade**

**Précipitation au sulfate d'ammonium**

D'après les travaux de FEVOLD (voir Tableau I), nous savons que la FSH est soluble dans une solution de sulfate d'ammonium 2, 0 M à pH 6, 9. La plus grande partie de la LH est alors insoluble. Nous avons repris ce fractionnement sur notre préparation après la précipitation acide faite au stade précédent.

Les résultats sont donnés dans le Tableau VI. Le résidu R III a manifesté encore, à la dose de 2 mg, une action dans le test de STEELMAN et POHLEY. On ne peut cependant pas descendre au-dessous de cette concentration 2, 0 M en sulfate d'ammonium pour accroître la récupération de la FSH : la quantité de LH qui resterait soluble dans ce cas ferait perdre tout le bénéfice de l'opération.

Tableau VI

Répartition de l'activité FSH entre le surnageant et le résidu après un fractionnement par le sulfate d'ammonium 2, 0 M à pH 7, 0.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| Produit injecté | Dose totale injectée en mg | Nombre de Rats | Moyenne de poids des ovaires en mg avec erreur-type |
|---|---|---|---|
| Surnageant S (III) | 1 | 3 | 44, 28 ± 4, 57 |
| Résidu (R III) | 2 | 3 | 35, 68 ± 5, 55 |
| Témoins (NaCl) | 0 | 3 | 19, 76 ± 2, 05 |

Afin d'éliminer d'autres fractions inactives, nous avons étudié le comportement de la FSH en solution de sulfate d'ammonium, mais à pH 4. Le premier fractionnement est effectué en effet au voisinage du pH isoélectrique de la LH, alors que le second est plus proche de celui de la FSH.

Un premier essai a été effectué à une concentration 2, 0 M à pH 4. Un insoluble est écarté. La FSH est ensuite récupérée dans le surnageant de ce

fractionnement par addition de sulfate d'ammonium jusqu'à la concentration 3,2 M au même pH.

On constate alors, par l'examen des résultats donnés dans le Tableau VII, qu'une partie très importante de la FSH a déjà précipité dans ces conditions.

Tableau VII

Répartition de l'activité FSH après un second fractionnement par le sulfate d'ammonium 2,0 M ou 1,8 M à pH 4.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| Produit injecté | Dose totale injectée en mg | Nombre de rats | Moyenne de poids des ovaires en mg avec erreur-type |
|---|---|---|---|
| Insoluble à 2,0 M pH 4 | 1,0 | 4 | 128,96 ± 13,92 |
| Insoluble à 3,2 M pH 4 | 0,5 | 3 | 108,10 ± 13,48 |
| Témoins (NaCl) | 0 | 3 | 32,78 ± 4,56 |
| Insoluble à 1,8 M pH 4 ($SIII\ R_2$) | 0,5 | 3 | 34,11 ± 7,84 |
| Insoluble à 3,2 M pH 4 ($SIII\ R_3$) | 0,2 | 4 | 113,72 ± 28,78 |
| Témoins (NaCl) | 0 | 4 | 37,48 ± 2,32 |

Par conséquent, en comparant les résultats des Tableaux VI et VII on voit que l'abaissement de pH à la concentration 2,0 M en sulfate d'ammonium, entraîne la précipitation de la FSH.

Nous avons alors utilisé une concentration plus faible (1,8 M) en sulfate d'ammonium pour ce second fractionnement à pH 4. Les résultats (voir Tableau VII) confirment que dans ce cas, la FSH ne précipite pas. Un abaissement de pH de 7 à 4 entraîne donc une solubilité plus faible de la FSH dans les solutions de sulfate d'ammonium. Ce fait a été également constaté par REICHERT (114).

Un troisième fractionnement est répété, dans des conditions identiques de pH et de concentration saline, sur la fraction FSH recueillie après deux précipitations afin d'utiliser au maximum cette méthode de séparation qui élimine LH.

*Importance du temps d'évolution du précipité au cours des fractionnements par le sulfate d'ammonium*

Nous verrons au prochain stade que les fractionnements à l'éthanol donnent des résultats différents suivant les produits de départ.

Ce comportement différent a d'abord été observé entre des fractions qui ont subi soit un fractionnement, soit deux ou trois fractionnements par le sulfate d'ammonium. Puis, des préparations comprenant un même nombre de précipitations au sulfate d'ammonium présentaient aussi des différences de comportement, mais celles-ci étaient beaucoup plus faibles. Ce dernier cas a été observé en comparant des essais entrepris sur des petites quantités de protéines et des préparations faites à partir de 1 ou 2 kg d'hypophyses fraîches. La seule différence entre ces deux types de préparation venait de l'intervalle de temps entre les précipitations au sulfate d'ammonium et la centrifugation permettant d'isoler l'insoluble formé. Les grands volumes nous contraignaient à ne faire qu'une étape par jour, tandis que dans les petits essais nous pouvions faire deux ou même parfois trois étapes de la préparation. Il en résultait des temps différents pour l'évolution des précipités, facteur qui nous semble responsable de la récupération de l'activité FSH au stade suivant, soit par 20 %, par 40 ou 50 % ou par 80 % d'éthanol selon les cas. Ainsi la quantité d'alcool nécessaire pour précipiter la FSH augmente avec le temps passé en solution dans le sulfate d'ammonium au stade précédent.

Nous préciserons donc dans le schéma de la préparation les temps que nous avons utilisés à chaque étape.

### 3ème stade

**Fractionnement par l'éthanol en présence d'acétate de zinc**

L'utilisation du fractionnement par l'alcool de l'extrait brut n'ayant pas été retenu, il devenait intéressant de l'étudier à nouveau sur une fraction plus purifiée. Nous décidions en même temps d'explorer la possibilité de faire ce fractionnement en présence d'acétate de zinc, en espérant obtenir un complexe FSH-Zn peu soluble. En réalité, la FSH est soluble, dans les conditions utilisées ici, en solution aqueuse contenant 45 % d'alcool ; par contre la présence de zinc semble faciliter la précipitation des impuretés. Au cours de ce fractionnement, comme nous venons de le voir ci-dessus, plusieurs cas sont possibles suivant le produit que l'on étudie.

a) **Cas d'un produit ayant subi une précipitation au sulfate d'ammonium**

La FSH ainsi précipitée est reprise par l'eau en quantité nécessaire pour obtenir une solution à 1 % en protéine. On dissout ensuite de l'acétate de zinc pour avoir une solution à la concentration de 0,005 M en ce sel, tandis que le pH est ajusté à 6 par l'acide acétique. Un insoluble Zn RI qui apparaît est éliminé. Enfin, on additionne goutte à goutte de l'alcool absolu refroidi à $-10°C$ jusqu'à la concentration de 20 %. Un nouvel insoluble (Zn R20) apparaît. Il est isolé. Puis l'addition d'alcool est poursuivie jusqu'à 40 %. Les différentes fractions obtenues sont alors dosées et les résultats rapportés dans le Tableau VIII-1°. On voit d'après les dosages que toute l'activité est recueillie dans la fraction qui précipite par 20 % d'alcool.

Cette fraction après remise en solution, précipite à nouveau en totalité par 20 % d'alcool.

b) **Cas d'un produit ayant subi deux fractionnements au sulfate d'ammonium**

Des fractions ayant subi deux fractionnements au sulfate d'ammonium sont alors soumises au même traitement que ci-dessus par l'éthanol avec des concentrations de 20 et 50 % en alcool.

Les résultats rapportés dans le Tableau VIII-2 nous montrent que par 20 % d'éthanol on ne précipite plus l'activité FSH. Il faut additionner entre 20 et 50 % d'alcool pour atteindre cette activité.

Tableau VIII

Répartition de l'activité FSH après un fractionnement à l'éthanol en présence d'acétate de zinc, d'un produit ayant subi une ou plusieurs précipitations au sulfate d'ammonium.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| Produit injecté | Poids des fractions en mg | Dose totale injectée en mg | Nombre de Rats | Moyenne de poids des ovaires en mg avec erreur type |
|---|---|---|---|---|
| 1/ *Après une précipitation au sulfate d'ammonium* | | | | |
| Fraction de départ | 500 | 0,5 | 3 | 46,52 ± 4,45 |
| Insoluble à pH 6 (ZnR1) | 20 | 0,5 | 4 | 38,01 ± 3,69 |
| Insoluble dans 20 % d'éthanol (ZnR20) | 140 | 0,5 | 4 | 88,58 ± 21,48 |
| Insoluble dans 40 % d'éthanol (ZnR40) | 49 | 0,5 | 4 | 40,53 ± 3,62 |
| Surnageant éthanol 40 % (ZnS40) | 84 | 0,5 | 4 | 33,62 ± 2,24 |
| Témoins (NaCl) | - | 0 | 4 | 28,57 ± 0,96 |
| 2/ *Après 2 précipitations au sulfate d'ammonium* | | | | |
| Fraction de départ | 509 | 0,2 | 4 | 79,81 ± 8,89 |
| Insoluble dans 20 % d'éthanol (ZnR20) | 207 | 0,1 | 4 | 38,98 ± 6,57 |
| Insoluble dans 50 % d'éthanol (ZnR50) | 200 | 0,1 | 4 | 75,23 ± 9,23 |
| Témoins (NaCl) | - | 0 | 4 | 33,06 ± 7,56 |
| 3/ *Après 3 précipitations au sulfate d'ammonium* | | | | |
| Fraction de départ | 295 | - | - | |
| Insoluble dans 20 % d'éthanol | 79 | 0,1 | 4 | 40,50 ± 2,28 |
| Insoluble dans 55 % d'éthanol | 122 | 0,2 | 4 | 38,78 ± 6,61 |
| Insoluble dans 80 % d'éthanol | 49 | 0,2 | 4 | 87,72 ± 7,49 |
| Témoins (NaCl) | - | 0 | 4 | 31,16 ± 3,93 |

Enfin, une fraction ayant précipité par 20 % d'alcool (donc après un fractionnement au sulfate d'ammonium) est soumise à un second fractionnement à pH 4 par le sulfate d'ammonium à la concentration 1,8 M. La FSH est récupérée par addition de sulfate jusqu'à 3,2 M. Puis elle est soumise au même fractionnement par l'éthanol en présence d'acétate de zinc. Les résultats sont les mêmes que ceux rapportés dans le Tableau VIII-2.

Par conséquent, l'action d'une seconde précipitation par le sulfate rend la FSH plus soluble dans l'éthanol, alors qu'un second fractionnement alcoolique ne change rien, comme on l'a vu au paragraphe précédent.

c) *Cas d'un produit ayant subi trois fractionnements par le sulfate d'ammonium*

Cette modification de comportement se confirme si l'on considère ce dernier essai effectué sur des fractions traitées par trois fractionnements au sulfate d'ammonium, suivant les conditions adoptées pour la préparation (voir Tableau VIII-3).

Il n'y a plus de précipité à pH 6. Puis les deux résidus obtenus par 20 et 55 % d'éthanol sont inactifs. Enfin, il faut atteindre 80 % d'alcool pour précipiter l'activité FSH dans ce milieu contenant l'acétate de zinc.

Par conséquent, on peut facilement additionner l'alcool jusqu'à 45 à 50 % et éliminer le résidu formé, sans perdre d'activité FSH tout en réalisant une bonne purification.

Dès lors, toutes les préparations de FSH furent soumises à trois fractionnements par le sulfate d'ammonium avec des temps suffisants pour permettre l'évolution des précipités afin de ne récupérer l'activité FSH que dans les limites de 45 % à 80 % d'éthanol.

Cette évolution du précipité dans le sulfate d'ammonium peut s'expliquer par le fait que des peptides se dissocient de la protéine insoluble liée à l'activité FSH. La molécule contenant l'activité est ensuite beaucoup plus difficile à récupérer au stade suivant par précipitation alcoolique, son poids moléculaire étant plus faible. Le taux de purification est alors le plus élevé pour le produit récupéré par précipitation alcoolique.

**4ème stade**

**Traitement d'un produit précipité par l'éthanol**

1/ **Echangeur de cations : l'Amberlite IRC 50 (XE 97)**

Parmi les échangeurs de cations, l'Amberlite a été très peu utilisée pour la purification de la FSH (seulement par McSHAN et MEYER qui signalent une adsorption de l'activité à pH 5). (93).

Nous avons choisi d'étudier cette résine en présence d'un tampon à pH 5 dans l'espoir de purifier la FSH.

a) *Préparation de la colonne*

La résine est d'abord purifiée suivant le procédé décrit par M. JUTISZ [(67)page 436].

On met la résine en suspension dans l'eau et, par décantations successives, on élimine les particules les plus fines. Puis on la traite par l'acétone et on la sèche.

On reprend la résine par une solution de soude à 40 % pendant plusieurs heures et on la lave dans une colonne, par plusieurs litres d'eau, jusqu'à pH 10 environ.

La résine en suspension est alors traitée par l'acide chlorhydrique 3 N, lavée par l'eau sur büchner jusqu'à neutralité et équilibrée avec le tampon choisi (ici : l'acide acétique-acétate de sodium 0,2 N à pH 5).

La résine est enfin introduite dans une colonne à chromatographie de 14 x 160 mm.

b) *Chromatographie d'une fraction précipitée par l'éthanol à 20 % (HXE II)*

Cette première chromatographie a été faite sur une fraction n'ayant subi qu'un seul traitement au sulfate d'ammonium et qui a donc été précipitée comme nous l'avons vu par 20 % d'éthanol.

On introduit sur la colonne 150 mg de fraction H15 Zn R20 dissoute dans 5 ml de tampon acide acétique-acétate de sodium à pH 5. On lave par quelques ml de ce tampon, puis on utilise un gradient de pH obtenu grâce à un tampon glycocolle-soude 0,2 N à pH 9,3, passant dans une fiole mélangeuse de 25 ml contenant le tampon acétate et placée à l'entrée de la colonne.

Les fractions de 3 ml sont recueillies et la concentration en protéine est déterminée par mesure de la densité optique à 280 mμ. Le débit est de 10 ml par heure. Le diagramme d'élution est donné par la figure 8.

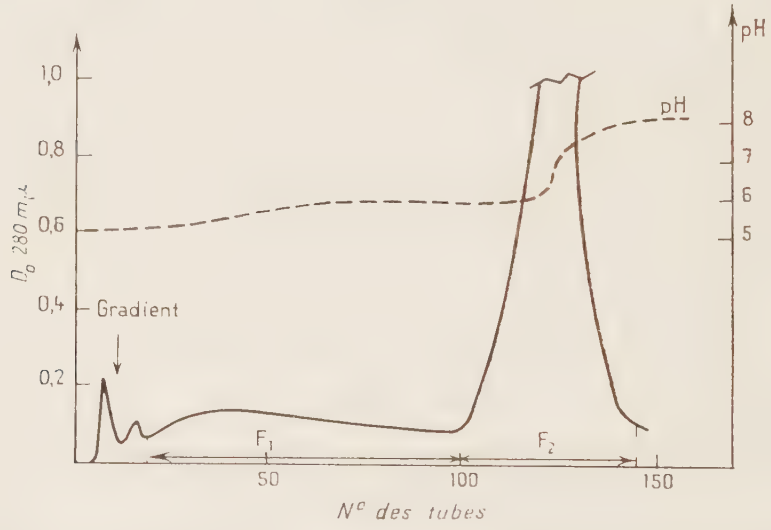



Fig. 8 - Chromatographie de 150 mg de FSH (H15 Zn R20) (préparation obtenue par précipitation au zinc) sur Amberlite IRC-50 (XE-97).

On constate qu'un pic important est élué lorsque le pH croît de 6 à 8.

Deux fractions sont collectées, le rendement total étant de 100 % en poids :

HXE II F1, environ 71 mg, est inactive,

HXE II F2, environ 84 mg, contient 90 % de l'activité FSH.

L'activité spécifique d'une telle fraction est équivalente à celle de l'étalon FSH. NIH. $S_1$. Cependant l'activité LH qui la contamine est encore très forte. (Voir résultats du dosage dans le Tableau XXXV).

Ce procédé ne permet donc qu'une purification faible de la FSH. Il sera abandonné de ce fait, la DEAE-cellulose étudiée ci-dessous étant plus efficace à ce stade.

2/ **Echangeur d'anions : La di-éthyl-amino-éthyl-cellulose : DEAE-cellulose**

Cet échangeur d'anions avait déjà été utilisé, comme on l'a vu, par quelques auteurs dont STEELMAN pour la FSH de porc, et ELLIS pour celle de mouton. Nous l'avons utilisée dans le tampon Tris-HCl 0,008 N à pH 7,3.

a) *Préparation de l'échangeur et de la colonne*

La DEAE-cellulose a été préparée au laboratoire suivant le procédé décrit par PETERSON et SOBER (108). Ce procédé consiste à faire réagir, dans les conditions données par ces auteurs, le chlorure de 2-chlorotriéthylamine avec de la poudre de cellulose AKU-FLOC ou WHATMAN traitée par la soude. Après plusieurs lavages par la soude N et l'acide chlorhydrique N on obtient une DEAE-cellulose dont la capacité d'adsorption est de 0,3 meq/gramme.

A présent, nous utilisons une DEAE-cellulose commerciale fournie par la maison Brown et qui possède une capacité de 0,89 meq/g.

La DEAE-cellulose en poudre est mise à gonfler pendant 24 heures, soit dans l'eau, soit dans une solution légèrement alcaline. La suspension obtenue est versée dans une colonne. On lave la DEAE-cellulose dans cette colonne par de la soude 0,2 N jusqu'à l'élimination complète des impuretés absorbant à 280 mμ, puis par de l'eau jusqu'à pH 8 à 9 ; enfin, on équilibre avec le tampon Tris-HCl 0,008 N, à pH 7,3, tampon qui servira pour la chromatographie.

Dans une série d'expériences, nous avons utilisé une colonne de 1,8 × 17 cm, soit environ 40 ml d'adsorbant. Il faut contrôler que le pH de la solution sortant de la colonne soit identique à celui de la solution d'origine, avant de commencer toute opération de chromatographie.

L'équilibre en température est obtenu en laissant la colonne une nuit, au moins, en chambre froide. Il est possible d'introduire sur ce type de colonne jusqu'à 2 g environ de protéine sans saturation. En fin de chromatographie, la DEAE-cellulose est recyclée par lavage à la soude 0,2 N, puis à l'eau et enfin équilibrée à nouveau à pH 7,3. Une telle colonne nous a donné des résultats satisfaisants pendant 10 à 12 chromatographies successives.

b) *Chromatographie d'un produit Zn R20 ou Zn R80 (H De 7)*

Un échantillon lyophilisé de 615 mg de la fraction H 16 Zn R20, obtenu par précipitation dans 20 % d'alcool (voir page 37) est dissous dans 100 ml de tampon Tris-HCl 0,008 N, à pH 7,30, et le pH de la solution est vérifié après cette dilution. A présent, nous partons de la fraction Zn R80, donc légèrement plus purifiée que le produit précédent.

La protéine est introduite sur la cellulose avec un débit maximum de 80 ml/heure et la solution qui sort de la colonne est collectée par fractions de 8 ml. On lave la colonne avec le tampon initial, puis on commence l'élution des constituants retenus. On évalue la concentration de la protéine à la

sortie de la colonne par mesure de la densité optique à 280 mμ dans chaque fraction recueillie.

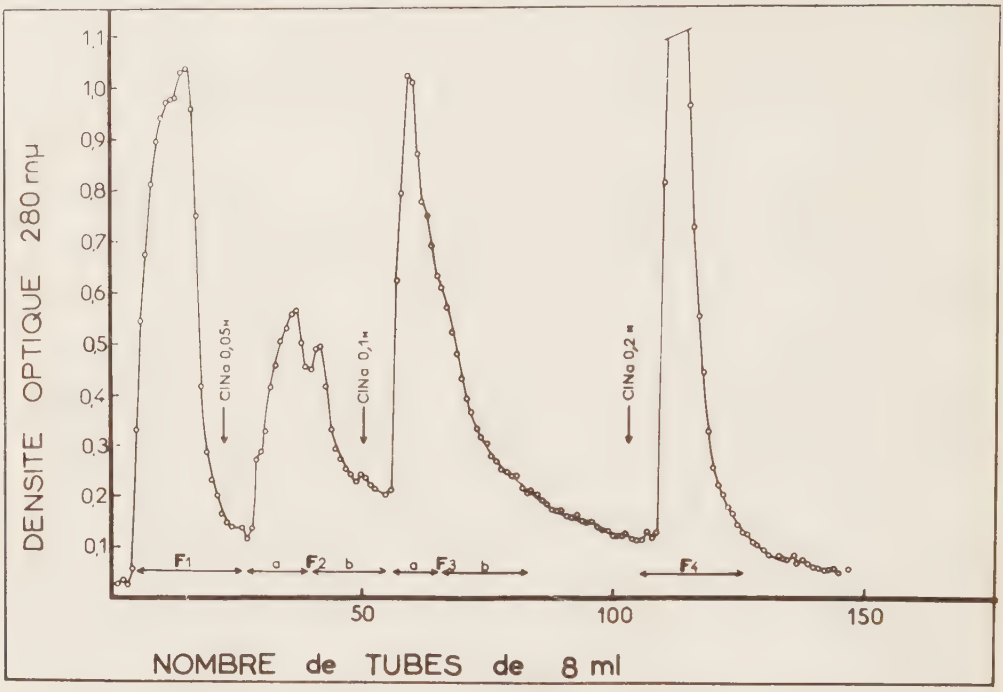



Fig. 9 - Chromatographie de 615 mg d'une FSH partiellement purifiée H16 Zn R20 (fraction alcool zinc) sur DEAE-cellulose. Colonne (1, 8 x 17 cm) équilibrée avec le tampon Tris-HCl 0, 008 N ; pH 7, 30. Elution graduelle par des solutions de NaCl de concentrations croissantes suivant les indications sur la figure.

Le diagramme d'élution est représenté figure 9. Quatre fractions principales sont obtenues. La première représente la protéine non adsorbée dans le tampon initial. Les autres fractions sont obtenues en additionnant, au tampon Tris-HCl initial, du chlorure de sodium respectivement à des concentrations de 0, 05 M, 0, 1 M et 0, 2 M. La colonne est enfin lavée par la soude 0, 2 N puis par l'eau avant d'être rééquilibrée par le tampon Tris-HCl.

L'activité biologique FSH est présente essentiellement dans le pic 3a de ce chromatogramme, soit environ 75 à 80 % suivant les cas. Le pic F3 est tantôt séparé très nettement en deux fractions, tantôt, comme sur la figure, il n'y a qu'une ébauche de séparation. Seule la première partie du pic 3a constitue la fraction que nous appelons "De". D'autre part, on retrouve un peu d'activité par le test de STEELMAN et POHLEY dans les fractions 2b et 3b, mais à des doses trois à cinq fois plus élevées (voir Tableaux IX et X).

Suivant le degré d'activité du produit initial, la purification obtenue avec cette opération est en moyenne de 10 à 15 fois.

c) *Rechromatographie de la fraction F 3a sur colonne de DEAE-cellulose* : (H De 20 - H De 21)

Afin d'améliorer si possible la purification de la FSH par ce procédé nous avons essayé une nouvelle chromatographie de la fraction active De F 3a dans les mêmes conditions que précédemment.

Tableau IX

Exemple de répartition de l'activité FSH après une chromatographie sur DEAE-cellulose (HDe7) représentée dans la figure 9.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| Produit injecté | Poids des fractions en mg | Dose totale injecté en mg | Nombre de Rats | Moyenne de poids des ovaires en mg avec erreur-type |
|---|---|---|---|---|
| Produit de départ (H1 6ZnR20) | 620 | 0,25 | 5 | 83,80 ± 16,24 |
| Tubes 4 à 26 (F1) | 150 | - | - | - |
| Tubes 27 à 39 (F2a) | 55 | 0,1 | 5 | 32,30 ± 2,26 |
| Tubes 40 à 55 (F2b) | 31 | 0,1 | 5 | 62,44 ± 1,94 |
| Tubes 56 à 65 (F3a) | 100 | 0,1 | 5 | 109,96 ± 16,87 |
| Tubes 66 à 83 (F3b) | 74 | 0,1 | 5 | 65,42 ± 5,71 |
| Tubes 109 à 126 (F4) | 124 | - | - | - |
| Témoins (NaCl) | - | 0 | 5 | 26,60 ± 1,56 |

Tableau X

Exemple de bilan d'activité FSH après une chromatographie sur DEAE-cellulose d'un produit ZnR80

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).
Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Produit | Poids en mg | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Activité totale de la fraction U |
|---|---|---|---|
| Produit de départ (H55ZnR80) | 704 | 0,50 (0,32 - 0,74) | 350 |
| Fraction active après chromatographie (HDe38F3a) | 38 | 7,65 (3,67 - 15,89) | 290 |

Pourcentage de récupération de l'activité : 83 %
Purification d'environ 15 fois

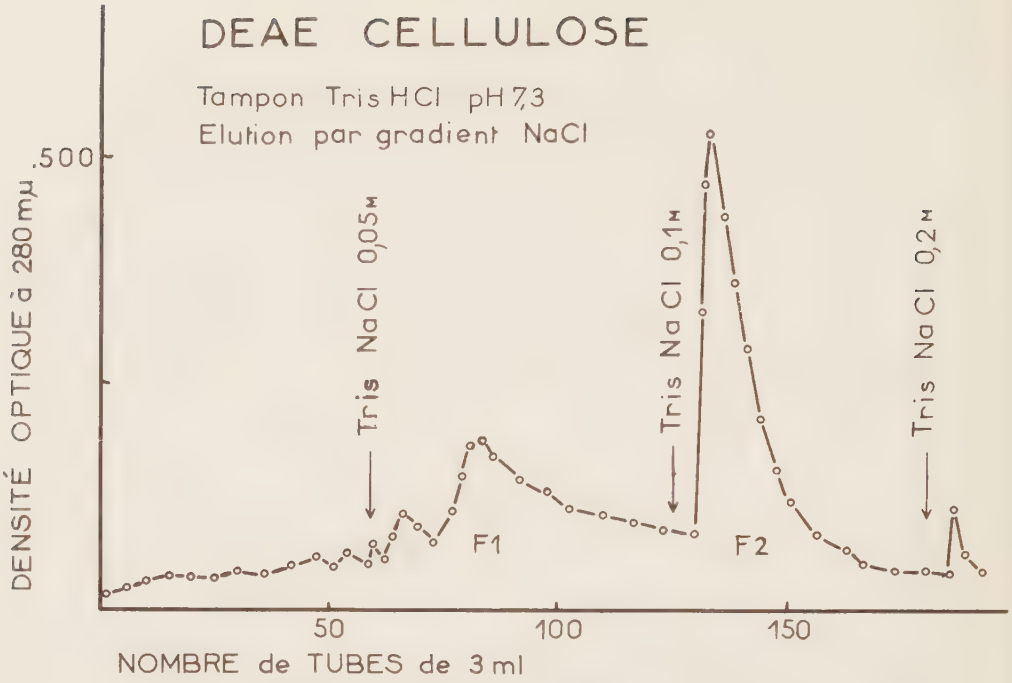



Fig. 10 - Rechromatographie sur DEAE-cellulose d'une FSH déjà purifiée une première fois par ce procédé.

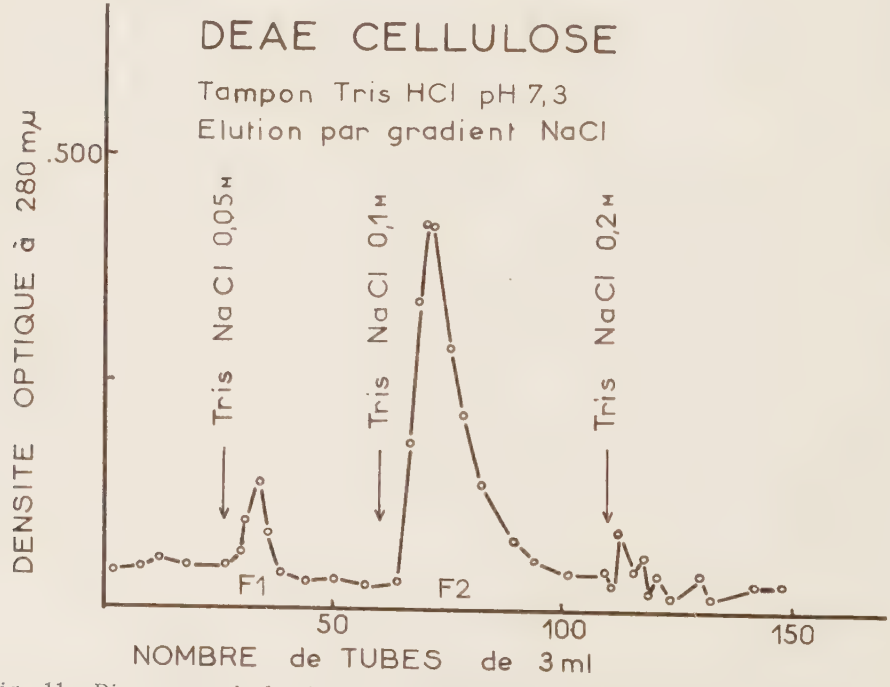



Fig. 11 - Diagramme de la chromatographie d'une fraction FSH déjà chromatographiée 2 fois sur DEAE-cellulose.

La protéine a été, à ce stade, retenue complètement sur la colonne (Voir diagramme 10).

Deux fractions sont collectées à l'élution : De 20 F1 peu active, tandis que De 20 F2 éluée comme dans la première chromatographie par le chlorure de sodium 0,1 M contient pratiquement toute l'activité récupérée.

Il n'y a aucune amélioration de l'activité spécifique dans F2.

Une troisième chromatographie effectuée dans les mêmes conditions sur ce pic De 20 F2 conduit à la même conclusion (voir Fig. 11).

Dans les deux cas, la récupération en activité n'est que de 80 % en moyenne par opération ce qui, compte tenu de l'absence de purification, rend ces rechromatographies peu rentables.

d) *Rechromatographie des fractions De F2b* (*) *sur DEAE-cellulose* (H De 40)

Ayant toujours observé la présence d'activité biologique dans les fractions De F2b (Voir Tableau IX), nous avons cherché à récupérer la FSH en chromatographiant à nouveau un mélange de ces fractions obtenues au cours d'opérations successives.

La figure 12 nous montre le diagramme d'élution d'une chromatographie H De 40 faite sur ces fractions De F2b, dont le poids est de 319 mg.

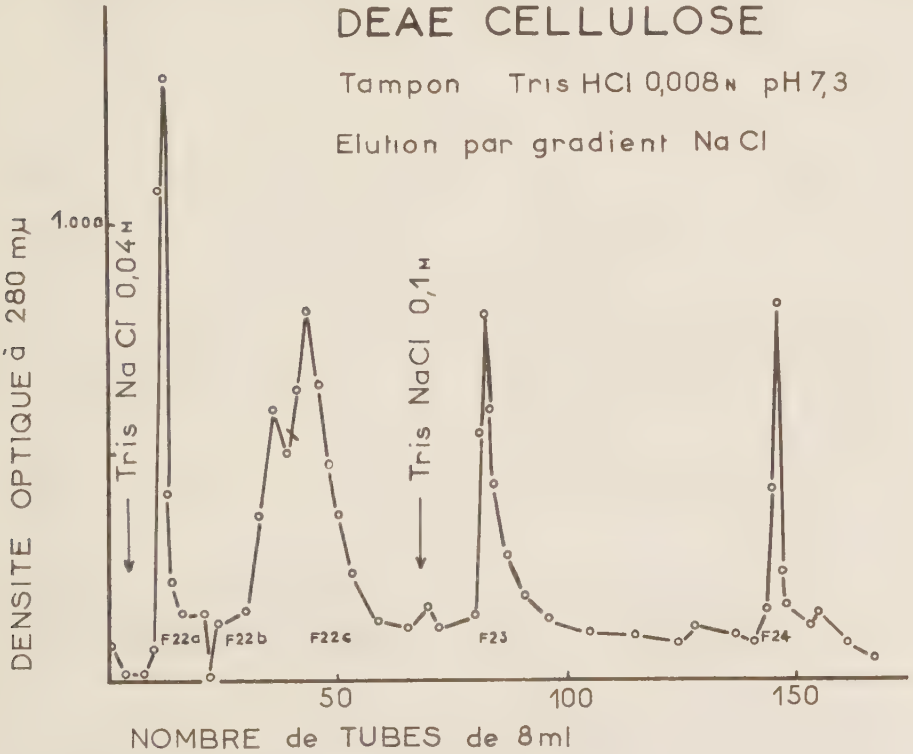



Fig. 12 - Essai de récupération, par chromatographie sur DEAE cellulose (HDe 40), de l'activité FSH dans les fractions De F2C.

---

(*) Fractions secondaires de la chromatographie sur DEAE-cellulose.

Avec le tampon Tris-HCl additionné de NaCl 0,04 M, nous recueillons trois fractions, puis avec NaCl 0,1 M une fraction De 40 F23, qui est inactive.

Seule la fraction De 40 F22c (76 mg) présente à nouveau une activité appréciable (Voir Tableau XI). Il n'est donc pas possible, tout au moins par ce procédé, de récupérer l'activité FSH qui se trouve contenue dans les fractions De F2b.

**5ème stade :**

**Traitement de la fraction obtenue par chromatographie sur DEAE-cellulose**

1/ **Chromatographie sur Amberlite IRC 50**

La DEAE-cellulose nous ayant permis de purifier la FSH de 10 fois environ (activité spécifique de 5 à 8 unités par mg), nous avons essayé de la soumettre après ce stade à une nouvelle chromatographie sur Amberlite.

L'opération est faite dans les mêmes conditions que précédemment (Voir page 40) sur 100 mg d'une fraction De7 F3a issue de la DEAE cellulose.

Nous constatons que la courbe d'élution (Voir fig. 13) est complètement modifiée. Il y a trois constituants et seule la fraction HXE12 F3, éluée quand le pH croît de 6 à 8, est active comme le montre la courbe d'activité.

La fraction HXE12 F3 représente environ 36 % en poids de la protéine soumise à cette chromatographie.

Quant à l'activité spécifique, elle n'est pas améliorée et le produit titre environ 5 unités FSH par mg.

28 mg de cette fraction HXE12 F3 sont repris dans les mêmes conditions pour une nouvelle chromatographie (Voir fig. 14).

Un seul pic est obtenu et la courbe d'activité recouvre ce pic sans amélioration de l'activité spécifique qui reste de 6 à 7 unités par mg.

Le poids recueilli (8,5 mg) dans la fraction principale HXE13 F3 rend évidente une nouvelle perte d'activité biologique. Par conséquent, l'absence de purification, accompagnée d'une perte importante d'activité totale, nous a amené à abandonner les chromatographies sur Amberlite faites dans ces conditions. Le Tableau XXXVI donne quelques résultats d'études biologiques effectuées avec la fraction HXE13 F3.

Enfin, des dosages ont été faits pour savoir s'il n'y avait pas élimination d'une substance capable de potentialiser l'activité FSH de la fraction F3.

Tous les essais de reconstitution du produit d'origine par mélange des fractions issues de la chromatographie ont été négatifs. La fraction F3 a toujours donné la même réponse, qu'elle soit dosée seule ou associée. La perte d'activité est donc due, dans ces opérations, à une dénaturation sur la colonne.

2/ **Chromatographie sur Carboxyméthylcellulose ou CMC**

La dénaturation constatée sur Amberlite pouvait être moins importante sur un échangeur de cations cellulosiques. Nous avons pensé utiliser la CMC qui a également été employée par d'autres auteurs.

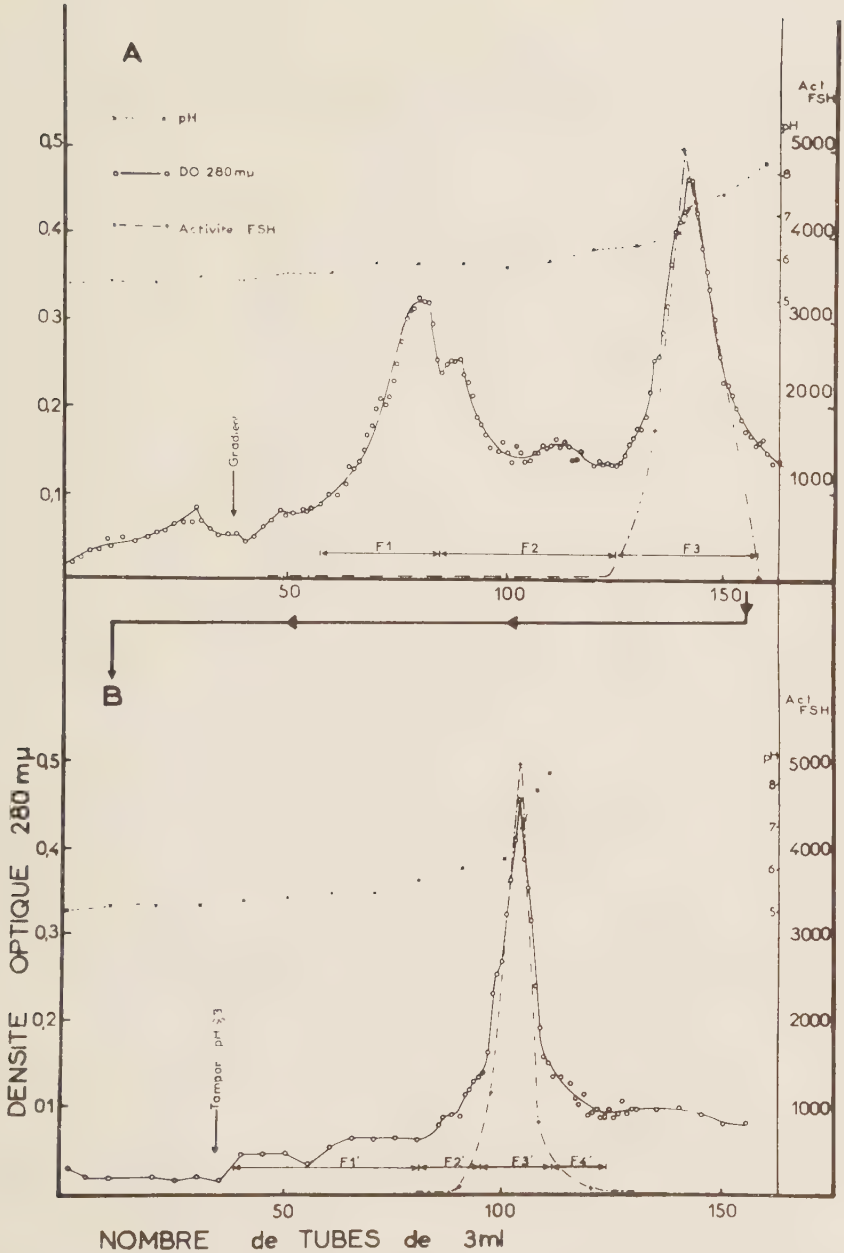



Fig. 13 A - Chromatographie d'une fraction De F3a sur Amberlite IRC 50 (XE 97). Colonne équilibrée par le tampon acide acétique -acétate de sodium 0,2 M pH 5,0- Elution par gradient de pH : tampon glycocolle- NaOH 0,2 N, pH 9,3 + tampon acétate précédent.

Fig. 14 B - Rechromatographie de la fraction F3 ci-dessus sur Amberlite IRC-50 (XE-97). Elution directe par le tampon glycocolle-NaOH 0,2 N pH 9,3.

Tableau XI

Essai de récupération par chromatographie sur DEAE-cellulose (HDe40) de l'activité FSH contenue dans des fractions De F2b(*) regroupées. (Voir fig. 12).

| Produit | Poids en mg | Dose totale injectée µg | Moyenne de Poids des ovaires en mg avec erreur type | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Rats traités | Rats témoins |
| Produit de départ | 319,0 | 100 | 111,34 + 12,35 | 47,80 ± 1,74 |
| Tubes 31 à 39 (F22b) | 31,3 | 100 | 65,11 ± 7,17 | 40,84 ± 2,31 |
| Tubes 40 à 56 (F22c) | 72,6 | 25 | 51,81 ± 6,80 | 40,84 ± 2,31 |
| | | 50 | 75,10 ± 3,72 | 40,84 ± 2,31 |
| Tubes 81 à 91 (F23) | 55,0 | 10 | 44,99 ± 2,39 | 39,68 ± 3,13 |
| | | 20 | 39,90 ± 7,24 | 39,68 ± 3,13 |

La récupération en poids est de 67 %.

(*) Les fractions DeF2b sont des sous-produits peu actifs de la chromatographie sur DEAE-cellulose des produits ZnR80 (voir fig. 9).

La CMC a été préparée au laboratoire suivant la technique de PETERSON et SOBER (108).

Au moment de l'utilisation, cette cellulose est mise à gonfler une nuit au moins dans une solution de NaCl à 0,9 %, puis on verse la suspension dans la colonne. On équilibre l'échangeur à pH 4,6 par le tampon acétate d'ammonium 0,01 M. A titre d'exemple, nous donnons la chromatographie HCM2 :

La colonne utilisée ici est de 1,3 x 50 cm. La protéine étudiée, 86 mg de la fraction H De34 F3a, provient de la chromatographie sur DEAE-cellulose. Elle est introduite sur la colonne à raison de 15 à 20 ml par heure, puis un rinçage par 5 ml de tampon est effectué.

Une fiole mélangeuse de 50 ml permet d'obtenir un gradient pour l'élution comme dans le cas de la chromatographie sur Amberlite. Un premier gradient est constitué par l'acétate d'ammonium 0,1 M à pH 7,0, et un second par un tampon de glycocolle-soude 0,2 N à pH 9,6.

Les fractions recueillies sont de 5 ml. Nous avons déterminé dans chaque tube le pH, la conductivité ainsi que la concentration en protéine par mesure de la densité optique à 280 mµ.

Une première fraction (Voir fig. 15) non adsorbée est inactive. L'activité FSH est éluée dans le second pic, F2. Malheureusement il n'y a aucune augmentation de l'activité spécifique.

Les rendements en poids -45 %- ainsi qu'en activité -44 % nous ont fait abandonner ce procédé qui se révèle aussi dénaturant que la chromatographie sur Amberlite.

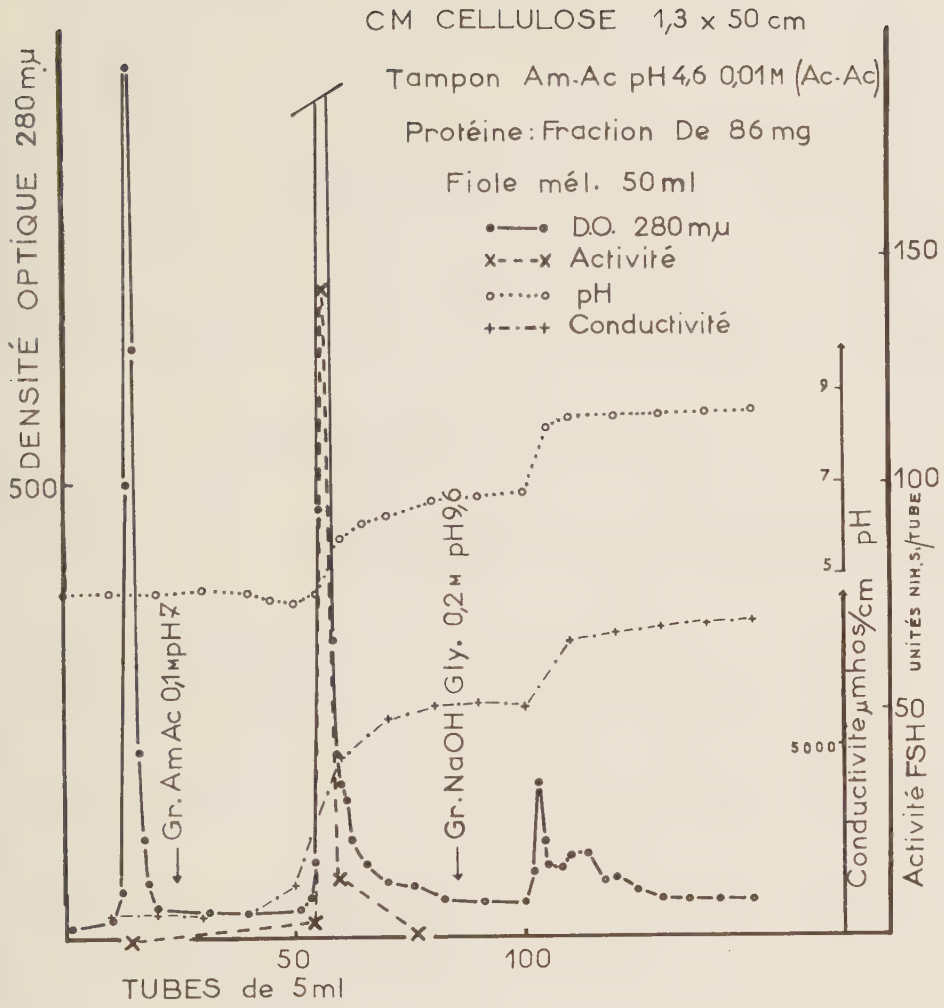



Fig. 15 - Chromatographie sur CM-cellulose.

Dans ces deux expériences faites sur échangeurs de cations, il est probable que la FSH est retenue sur la colonne après ouverture des liaisons hydrogène, ce qui peut expliquer la perte importante d'activité biologique.

### 3/ Filtration sur gel Sephadex(*)

A partir de 1959 (111), une technique nouvelle devint utilisable : la filtration sur gel Séphadex (138). Ce gel est constitué par un dextrane réticulé obtenu par synthèse. Il se présente sous forme de grains à dimensions de mailles variables.

---

(*) Ce produit est commercialisé par la maison PHARMACIA, à Upsala (Suède)

Dans la technique que nous utilisons, il permet de fractionner les constituants d'un soluté suivant leur taille (poids moléculaire) et leur forme. C'est donc un tamisage moléculaire.

a) *Principe*

Les grains de Séphadex sont vendus à présent après calibrage au tamis en deux catégories : moyens ou fins. Ils sont d'abord mis à gonfler dans une solution saline. Ils atteignent alors un état qui dépend du solvant et de l'architecture du Séphadex employé. La grosseur des mailles de ces grains est, en effet, fonction du degré de réticulation. Après mise en colonne de la suspension obtenue, la pénétration des grains de Séphadex par les molécules d'un soluté dépend de la structure moléculaire du Séphadex et de la constitution même du soluté. On peut définir pour chaque constituant un coefficient $K_D$, qui détermine sa distribution dans les phases intra et extragranulaires suivant la relation

$$K_D = \frac{\text{concentration dans la phase intragranulaire}}{\text{concentration dans la phase extragranulaire}}$$

Pour un constituant qui est exclu des grains de Séphadex, on a donc $K_D = 0$ et pour un constituant qui pénètre complètement : $K_D = 1$. La variation est donc en première approximation comprise entre 0 et 1 pour des composés ne donnant pas d'inter-action.

Les possibilités de séparation de deux constituants sont alors fonction de ce coefficient et de la hauteur de la couche de Séphadex dans le colonne.

Chaque catégorie de Séphadex est définie par sa limite d'exclusion. C'est le poids moléculaire le plus faible que l'on puisse trouver pour un constituant complètement exclu ($K_D = 0$).

Pour les Sephadex actuellement produits les limites d'exclusion sont les suivantes, d'après le fabricant :

| | | |
|---|---|---|
| G 25 | Limite d'exclusion : | 3 500 à 4 500 |
| G 50 | " " | 8 000 à 10 000 |
| G 75 | " " | 40 000 à 50 000 |
| G 100 | " " | 100 000 |
| G 200 | " " | 200 000 |

Si un constituant a un poids moléculaire supérieur à cette limite d'exclusion, il traverse la colonne, en migrant dans l'espace intergranulaire. Le volume de solvant nécessaire pour faire sortir complètement ce constituant de la colonne est appelé *volume d'exclusion*. Par contre, un constituant de poids moléculaire inférieur pourra passer à travers le réseau de Sephadex, donc entrer dans les grains, ce qui retardera sa migration dans la colonne par rapport au constituant exclu.

La migration à travers le gel se fait donc, en première approximation, d'après les poids moléculaires décroissants, la facilité de pénétrer dans les grains étant plus ou moins grande suivant la taille des molécules.

Cependant, d'autres facteurs interviennent, comme par exemple la forme de la molécule, les couches ionisées qui peuvent se former autour des grains de Sephadex et les phénomènes d'adsorption, etc. C'est l'ensemble de tous ces phénomènes qui permet de réaliser des fractionnements.

b) *Préparation de la colonne*

Les grains de Sephadex sont d'abord mis à gonfler dans une solution saline de force ionique voisine de celle du sérum physiologique, pendant 24 heures à 7 jours suivant que l'on utilise le G 25 ou le G 200. Ce temps est intermédiaire pour les autres catégories. Puis le Sephadex est remis en suspension dans le tampon qui sera utilisé pour la filtration. La colonne étant installée verticalement, on fixe à son extrémité supérieure un tube de 1 mètre de longueur et de même diamètre que la colonne. On remplit avec du tampon, jusqu'au niveau de la colonne et dans le reste du montage on introduit la suspension de Sephadex. Quand la colonne est formée, on fait passer une quantité de tampon suffisante pour l'équilibrer.

Afin de pouvoir séparer des constituants de poids moléculaire voisins, nous utilisons des colonnes longues et de faible diamètre. Au début de notre étude, les dimensions étaient de 1,6 × 80 cm pour des colonnes analytiques, et 2,7 × 120 cm pour des colonnes préparatives.

Pour les mêmes raisons que ci-dessus, l'échantillon à filtrer devra être introduit sous le plus petit volume possible afin de ne constituer au départ qu'une bande de faible hauteur.

On vérifie enfin l'état du remplissage de la colonne en faisant passer un composé coloré. (Nous avons utilisé ici l'acide dinitrophényl-aspartique).

Toutes les opérations de filtration sont faites à 4°C.

c) *Utilisation des différentes sortes de Sephadex*

c.1) Cas du Sephadex G 25 (HS 5) :

Le Séphadex G 25 a été utilisé uniquement pour déminéraliser des fractions issues d'une chromatographie sur DEAE-cellulose.

La différence de poids moléculaires des produits à fractionner est très grande (protéines et sels), de sorte que la totalité des protéines sort de la colonne dès que le volume d'exclusion est atteint.

Les volumes traités au départ (250 à 300 ml) sont ici beaucoup plus grands : la limite du volume à filtrer est imposée par les dimensions de la colonne. Nous avons utilisé des colonnes de 4 × 85 cm.

La fraction protéique est introduite sur la colonne avec un débit maximum (environ 60-80 ml/heure). Puis la colonne est lavée à l'eau bidistillée.

On recueille l'éluat sur un collecteur de fractions (10 ml par tube). La courbe de densité optique à 280 mμ représente sur le diagramme figure 16 la partie protéique, tandis que celle de conductivité matérialise l'élution des sels. On voit que ces deux fractions sont bien séparées, ce qui est confirmé par les dosages biologiques (Voir Tableau XII).

c.2) Cas des autres catégories de Sephadex :

Etant donné le poids moléculaire présumé de la FSH -environ 30 000- il faut un Sephadex dont la limite d'exclusion soit nettement supérieure.

Afin de faire une étude systématique, nous avons utilisé toutes les catégories de Sephadex, du G 50 au G 200.

c.3) Mode opératoire

Le Sephadex choisi, préparé comme il a été dit ci-dessus, est mis en colonne analytique (1,6 × 80 cm). Le tampon est, dans toutes ces expériences,

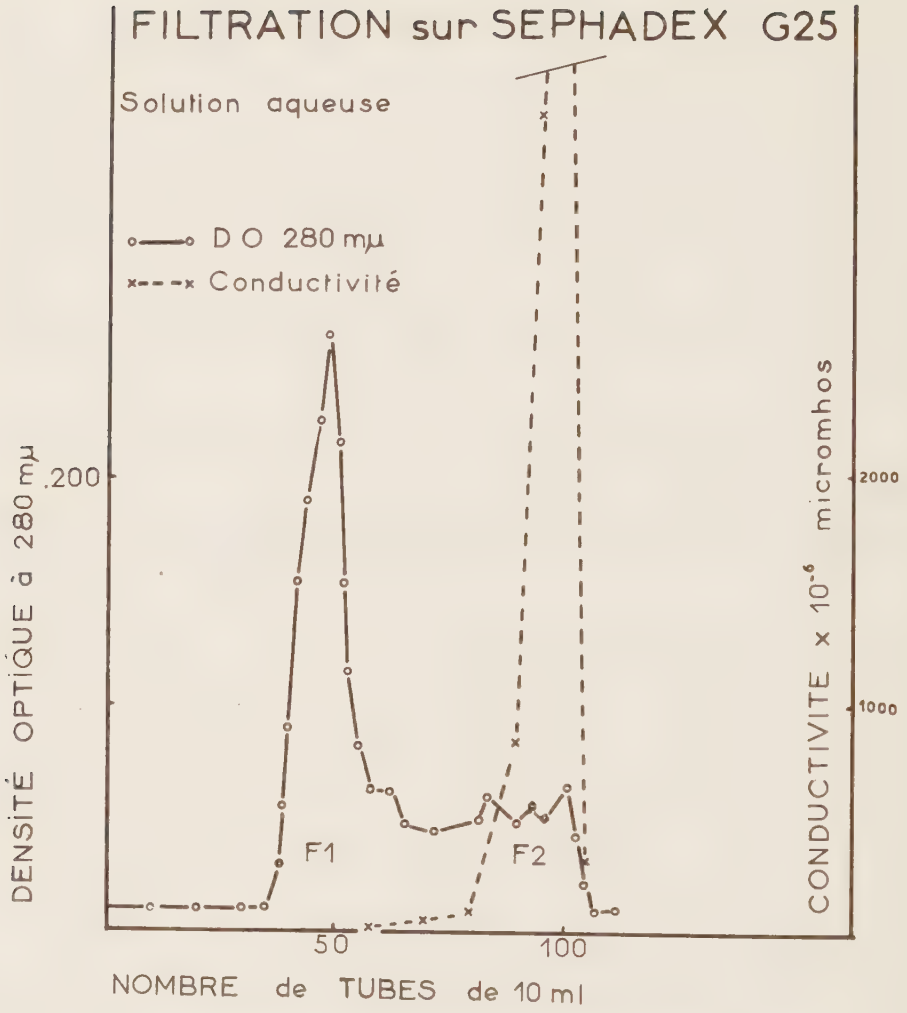



Fig. 16 - Traitement déminéralisant d'une fraction De F3a.

un tampon volatil, soit l'acétate de pyridine 0,05 M à pH 5, soit le bicarbonate d'ammonium 0,1 M à pH 8,6.

L'échantillon (une fraction "De" d'environ 30 mg par étude) est introduit sur la colonne dans 0,1 à 0,2 ml de tampon (Voir page 66). La colonne est lavée par le même tampon. Le débit est d'environ 4 à 6 ml/heure.

Les fractions, à la sortie de la colonne, sont de 2 ml. On évalue la densité optique à 280 mμ dans chacun des tubes afin de déterminer la zone d'élution de la protéine. Enfin, on recherche l'activité biologique dans les fractions récoltées.

Tableau XII

Répartition de l'activité FSH après une filtration sur Sephadex G-25
(Voir figure 16)

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| Produit | Poids (mg) | Dose totale injectée µg | Nombre de Rats | Moyenne de poids des ovaires en mg avec erreur type |
|---|---|---|---|---|
| Tubes 40 à 57 (F1) | 60 | 15 | 5 | 62,64 + 16,92 |
| | | 30 | 5 | 77,93 ± 10,57 |
| Tubes 58 à 93 (F2) | (102) | 50 | 5 | 29,41 ± 3,06 |
| | | 100 | 5 | 29,72 ± 3,21 |
| Témoins (NaCl) | - | 0 | 5 | 29,95 ± 5,27 |

d) *Etudes des facteurs qui modifient la filtration*

d. 1) Influence du degré de réticulation :

Les Sephadex G 50 et G 75 ont donné des résultats très voisins. La totalité des protéines est éluée dans un pic qui s'étend sur 5 tubes de 2 ml. L'activité biologique est située dans la partie descendante du pic de densité optique. La purification est très faible.

La figure 17 représente une filtration d'une fraction "De" sur G 100. On peut voir, d'après la courbe des densités optiques, que cette fraction "De" peut être fractionnée en plusieurs constituants. La courbe d'activité de la FSH se situe sur la partie descendante du pic de protéines. Nous avons marqué sur la figure la position du volume d'exclusion mesuré ici par passage de la thyroglobuline (•).

Après le regroupement des tubes présentant de l'activité FSH, nous observons une purification de 2 à 3 fois.

Le Sephadex G 200 enfin a été utilisé dans les mêmes conditions. L'étalement des protéines est ici à nouveau très faible, tous les constituants se trouvant également retardés dans ce support. Il n'y a pas de purification.

Par conséquent, le Sephadex G 100 se trouve être le plus approprié pour cette filtration.

Afin d'étudier les meilleures conditions de fractionnement, nous avons essayé de faire varier d'autres facteurs qui peuvent agir sur la séparation des protéines au cours de cette filtration.

d. 2) Influence du pH :

Nous avons essayé, dans le cas du Sephadex G 100, un tampon véronal 0,1 M à pH 8,6 et un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M au même pH.

---

(•) Cet échantillon de Thyroglobuline nous a été fourni par M. NUNEZ, Laboratoire de Biochimie comparée au Collège de France.

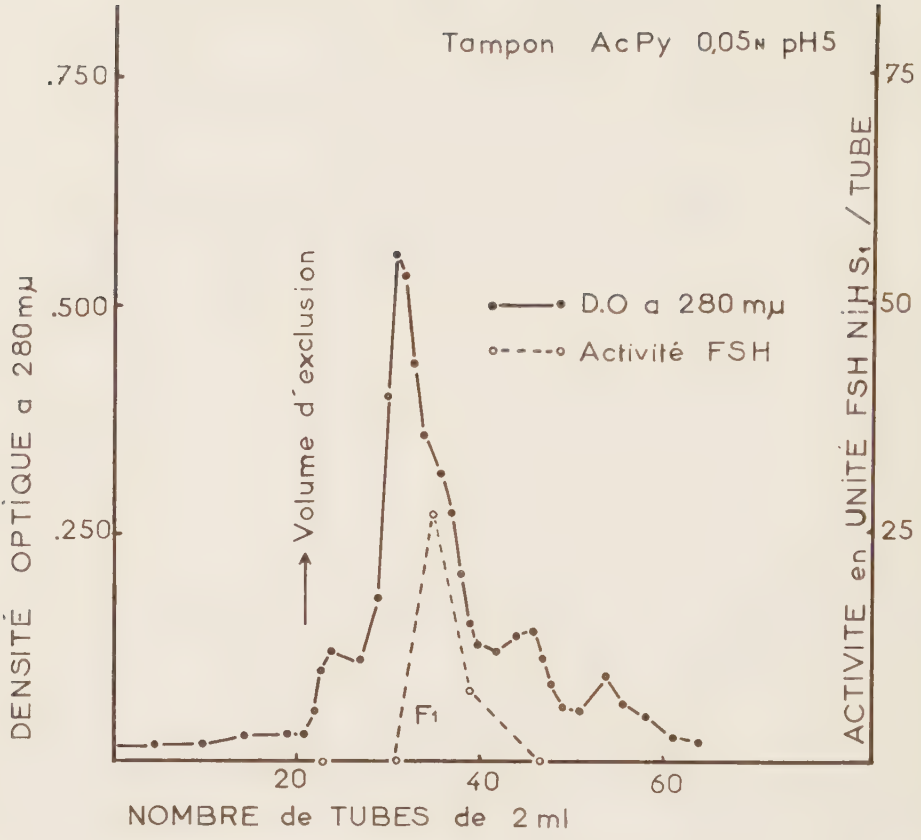



Fig. 17 - Filtration d'une Fr. De sur Sephadex G 100.

Les résultats du fractionnement ont été identiques à ceux obtenus à pH 5 dans le tampon acétate de pyridine.

d. 3) Influence de la concentration du tampon :

Dans nos essais, les mêmes résultats ont été obtenus avec le tampon acétate de pyridine à pH 5 de concentration 0, 05 M, 0, 10 M et 1, 00 M.

e) *Conditions expérimentales adoptées*

Après l'étude de tous ces facteurs, nous avons adopté le Sephadex G 100 pour purifier la FSH à ce stade, le tampon étant l'acétate de pyridine 0, 05 M.

*Mode opératoire* (filtration préparative)

Dans cet exemple, les dimensions de la colonne sont 2, 7 × 120 cm. Nous pouvons traiter dans ces conditions 240 mg d'une fraction issue de la DEAE-

cellulose. Les conditions expérimentales pour cette opération (HSx 129) sont proches de celles de la petite colonne. Les fractions collectées sont de 5 ml et le débit de la colonne de 10 à 15 ml par heure. Le diagramme d'élution est représenté sur la figure 18.

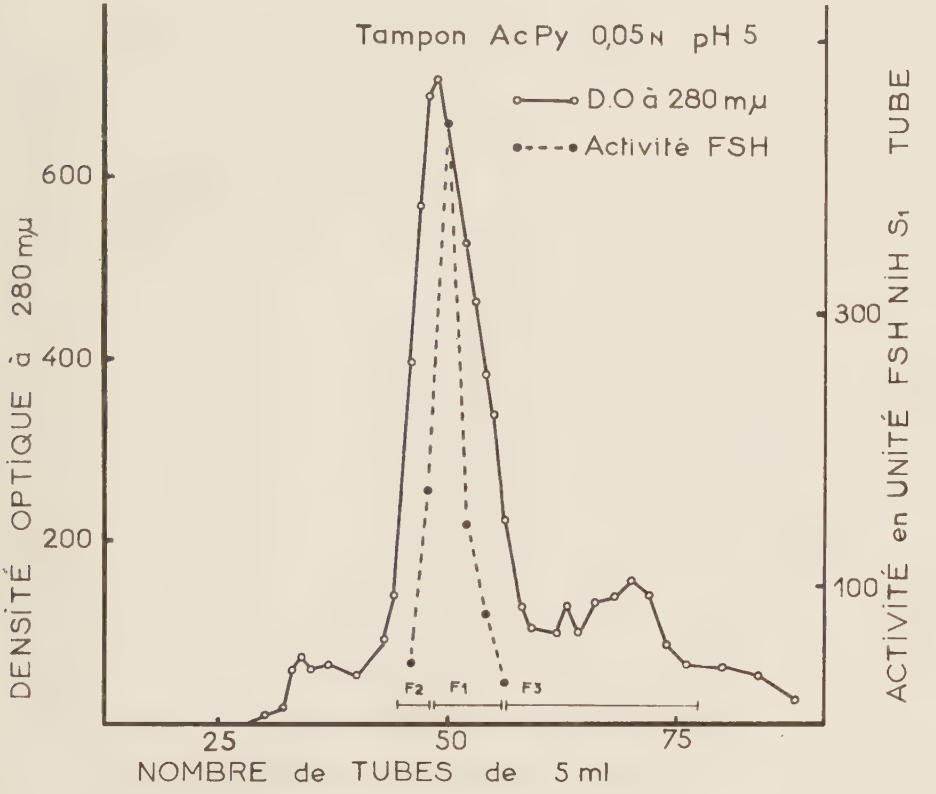



Fig. 18 - Filtration sur Sephadex G 100 - (colonne préparative).

Après regroupement des tubes d'activité comparable, nous obtenons 3 fractions possédant une activité FSH.

La fraction SxF1 est la plus active et a un titre de 15 à 22 unités par mg. La récupération d'activité dans cette fraction est d'environ 70 à 80 %.

Les deux fractions voisines de SxF1 contiennent le reste de l'activité mais ont des titres en FSH inférieurs. Elles peuvent être recyclées. Le rendement total en activité est de 100 % dans cette opération.

La purification dans la fraction SxF1 varie de 3 à 5 fois par rapport au stade précédent.

Les résultats sont donnés dans le Tableau XIII.

f) *Filtrations successives sur colonne Sephadex G 100*

Si, après avoir concentré dans 0,1 à 0,2 ml de tampon, nous filtrons à nouveau SxF1 sur une colonne analytique plus petite, nous obtenons un diagramme d'élution du type de celui représenté sur la figure 19.

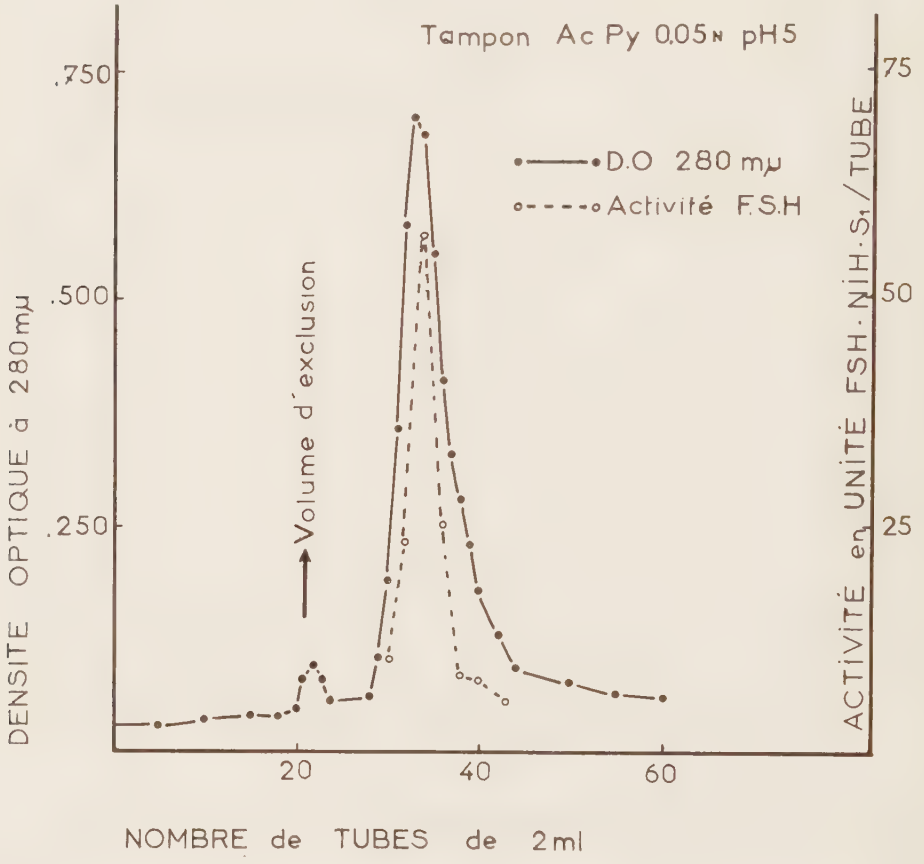



Fig. 19 - Diagramme de filtration sur Sephadex G 100 d'un produit déjà filtré 2 fois.

Ce pic, bien que plus symétrique que le précédent, présente encore une légère hétérogénéité. On peut alors séparer de la fraction active un constituant de poids moléculaire supérieur et d'activité spécifique plus faible. Le rendement total en activité est toujours de 100 % et la fraction écartée peut être recyclée.

La fraction active se trouve alors enrichie à nouveau par rapport au produit de départ.

Plusieurs filtrations peuvent être réalisées dans ces conditions pour accroître l'activité spécifique de la fraction FSH et la figure 20 nous montre le résultat obtenu après 4 filtrations successives.

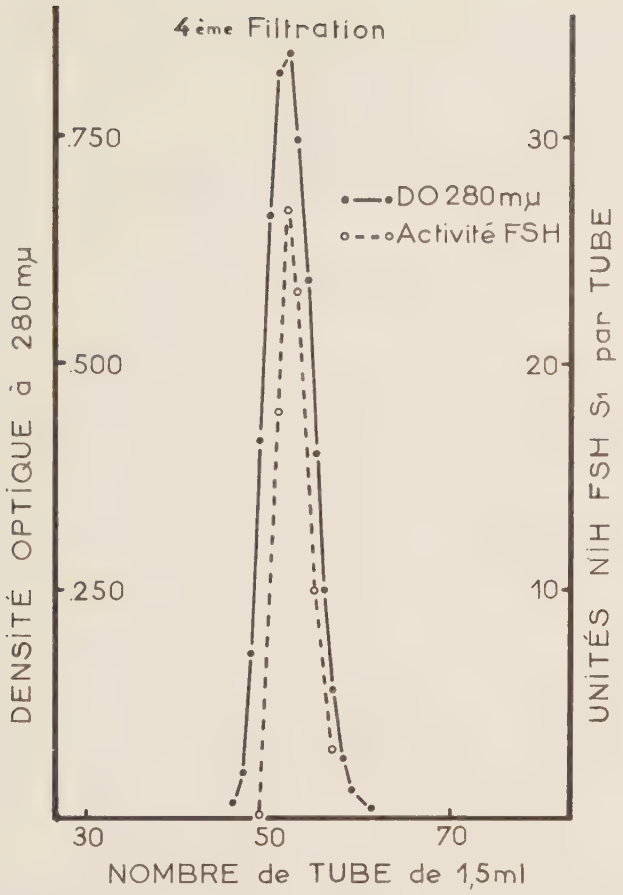



Fig. 20 - Diagramme d'une 4° filtration sur Sephadex G 100.

Nous donnons dans le Tableau XIV les valeurs de l'activité FSH obtenue, dans différentes préparations, au cours de cette étape sur Sephadex G 100.

En particulier, nous voyons dans le cas de HSx 124F1 dont l'activité spécifique après une filtration est seulement de l'ordre de 16 unités par mg, que des traitements successifs par Sephadex ont permis d'atteindre 18, 94 et 24, 23 unités par mg après 3 filtrations. C'est là, par conséquent, un procédé utilisable pour obtenir une FSH d'activité élevée.

Nous avons vu qu'à chaque stade de la préparation de l'hormone il existait de fortes différences dans l'activité spécifique des produits obtenus. Nous attribuons ce fait à des variations dues aux glandes, la période de leur prélèvement étant très importante. Le Sephadex permet alors, au dernier stade de la purification, d'acquérir après 2 ou plusieurs filtrations le produit le plus actif obtenu dans notre laboratoire, quel que soit au cours de la purification le niveau d'activité atteint à chaque stade.

Tableau XIII

Exemple de rendement en activité FSH d'une filtration sur Sephadex G 100 (HSx 129) suivant la figure 18.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Produit | Poids mg | % de récupération | Activité | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | U/fraction | % de récupération |
| Produit de départ (HDe52F3a) | 208 | - | 6,56 (3,20 – 13,43) | 1365 | - |
| Tubes 45 à 47 (F1) | 37,5 | 18 | 23,41 (17,37 – 33,80) | 881 | 65 |
| Tubes 42 à 44 (F2) | 27,0 | 13 | 10,11 (6,94 – 14,71) | 273 | 20 |
| Tubes 48 à 50 (F3) | 35,0 | 17 | 5,31 (2,96 – 9,56) | 186 | 14 |

Tableau XIV

Activité FSH de différentes préparations obtenues par filtration sur Sephadex G 100

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| N° de la préparation | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | $\lambda$ (*) |
|---|---|---|
| HSx115 F1 | 22,5 (12,0 – 41,9) | 0,18 |
| HSx117 F2 | 21,9 (10,9 – 44,3) | 0,21 |
| HSx127 F1 | 30,13 (23,59 – 38,48) | 0,11 |
| HSx124 F1 (1ère filtration (**)) | 16,45 (11,30 – 23,94) | 0,17 |
| HSx125 F3 (2ème filtration) | 18,94 (12,50 – 28,49) | 0,17 |
| HSx128 F2 (3ème filtration) | 24,23 (17,37 – 33,80) | 0,15 |

(*) Indice de présion

(**) Il s'agit dans ce cas de filtrations successives de la fraction active sur la même colonne de Séphadex G 100.

Enfin, comme on le verra d'après les études d'ultracentrifugation qui suivent, c'est également ce stade qui permet d'atteindre un degré élevé d'homogénéité dans la préparation de la FSH.

4/ **Electrophorèse de zone**

Que ce soit pour purifier la FSH ou pour démontrer son homogénéité, l'électrophorèse de zone nous a intéressé à partir de la fraction issue de la DEAE-cellulose. Comme nous l'avions vu, plusieurs auteurs ont également utilisé cette méthode (entre autres ces dernières années, McSHAN (120) sur la FSH de cheval).

Deux procédés d'électrophorèse de zone -soit en continu sur Pevikon, soit sur rigole d'amidon- sont décrits dans ce travail.

a) *Technique expérimentale*

Nous utilisons un appareil d'électrophorèse en continu, inspiré de la technique de PORATH (112). Le support solide est constitué par du Pevikon qui est un mélange de chlorure et d'acétate de polyvinyle dont les grains sont calibrés par tamisage.

Pour préparer la colonne on met le Pevikon en suspension dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 % pendant quelques heures, au cours desquelles on effectue plusieurs décantations, après agitation et sédimentation afin d'éliminer les particules fines ou non mouillées.

La colonne pour électrophorèse est formée d'un tube de verre de 1 x 40 cm (Voir fig. 21). A la partie inférieure, un rebord permet de placer une plaque de teflon percée de trous. On dépose un papier filtre sur cette plaque afin de retenir la suspension de Pevikon que l'on verse par petites portions. Après sédimentation des grains, on tasse ce support avec une baguette de verre. On vérifie qu'il est tassé régulièrement par passage d'un colorant.

Pendant l'électrophorèse, la colonne plonge dans un bac (B) contenant le tampon, et le circuit électrique est constitué par un pont liquide entre la colonne et le second bac (A). Les électrodes plongent dans les deux bacs A et B. A mesure que les fractions se présentent à la hauteur de la petite tubulure latérale, elles sont entraînées par le courant de tampon circulant par le tube capillaire en teflon (t). En effet, le niveau (n) étant maintenu constant grâce au flacon (F) et l'extrémité libre du tube (t) formant une dénivellation (d), un faible courant liquide lave continuellement le bas de la colonne de Pevikon. On pourra alors fractionner la solution sortant par le tube capillaire de teflon et ainsi recueillir les protéines dans l'ordre où elles migrent vers le bas de la colonne.

La protéine à étudier, dissoute dans 0,1 à 0,2 ml de tampon - est d'abord introduite sur la colonne. Puis on déplace, au moyen d'une faible quantité de tampon, la zone formée par la protéine de 2 à 3 cm vers le bas de la colonne. On constitue ensuite le pont liquide entre les deux bacs grâce à un système de rodage et de robinets permettant le remplissage de l'appareil avec le tampon. Enfin, après avoir établi le champ électrique, on règle la dénivellation (d) pour avoir le débit désiré (environ 1 ml par 30 minutes).

b) *Résultats obtenus par traitement d'une fraction "De"*

Nous avons soumis cette fraction FSH à des électrophorèses dans l'appareil que nous venons de décrire. Deux pH ont été retenus pour cette étude.

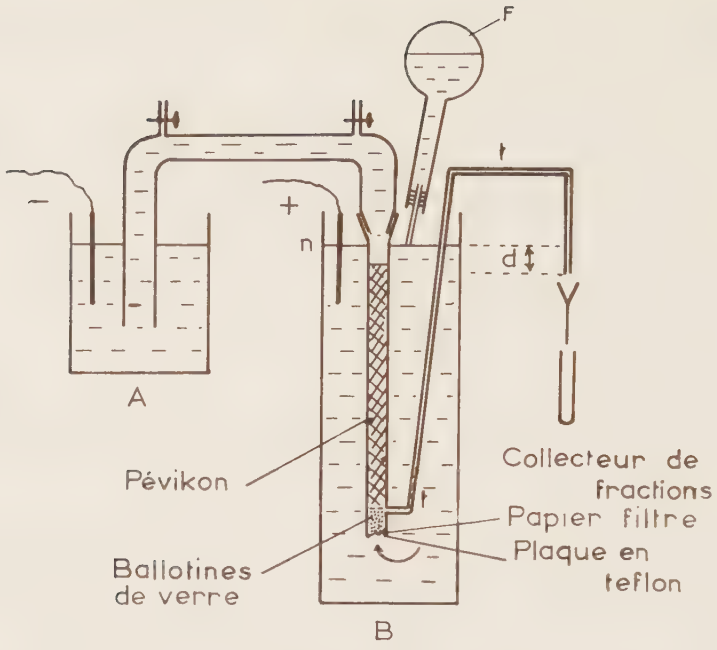



Fig. 21 - Electrophorèse de zone en continu.

b. 1) Essais à pH 8, 6 :

On utilise le tampon véronal de force ionique 0, 05 à pH 8, 6.

L'électrophorèse est faite sur 27 mg de fraction H De 25 F3 sous 500 volts et 10 à 11 mA, pendant 48 heures. On recueille des fractions de 1, 1 ml toutes les 30 minutes.

Un seul pic ayant migré vers l'anode est mis en évidence, par mesure de la densité optique à 280 mμ ; la récupération après réunion des tubes n'est que de 54 % en poids de protéine. Aucune activité FSH n'a pu être décelée dans les fractions recueillies.

b. 2) Essais à pH 5 :

Un autre essai est réalisé sur 26 mg de la fraction H De33 F3 dans le tampon acétate de sodium, de force ionique 0, 05 à pH 5, 0.

Les conditions d'électrophorèse sont voisines : 500 volts aux extrémités de la colonne, 10 à 11 mA, mais l'électrophorèse dure 100 heures. Les fractions recueillies sont de 0, 9 ml toutes les 30 minutes.

Un pic migrant vers l'anode apparaît après 24 heures d'électrophorèse. Il est suivi par une traînée (Voir fig. 22).

La récupération en poids est ici encore de 50 %. L'activité FSH est mise en évidence dans le début de la traînée, immédiatement après la sortie du pic.

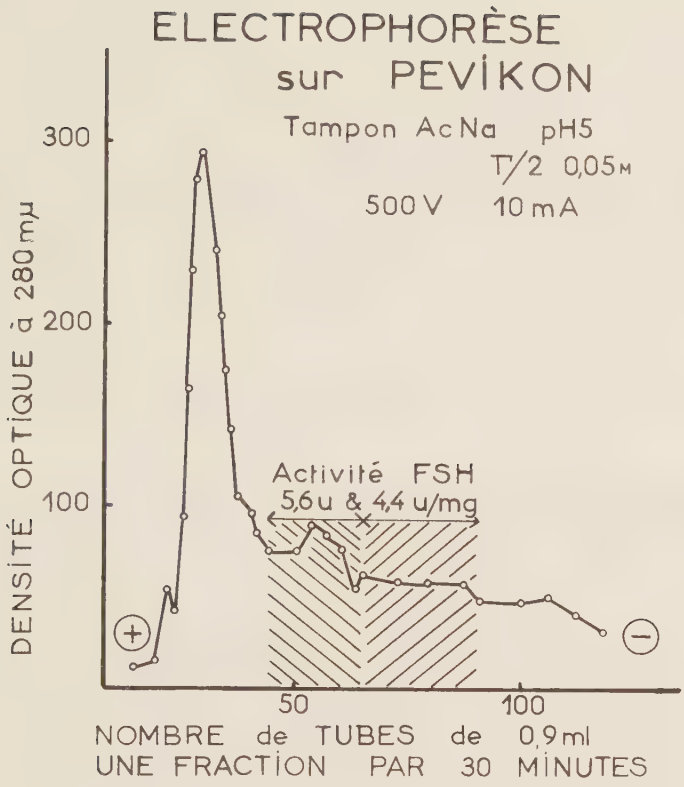



Fig. 22 - Electrophorèse d'une fraction issue d'une chromatographie sur DEAE-cellulose (HDe 33).

L'activité spécifique de la fraction active collectée est équivalente à celle du produit de départ.

La récupération en activité est inférieure à 50 %.

Du fait des rendements très faibles en activité de ce procédé, nous ne l'avons pas jugé utilisable. Nous verrons, en étudiant la pureté de la fraction "Sx" que l'électrophorèse semble dénaturer la FSH.

## CHAPITRE IV

# MÉTHODE ACTUELLE DE PRÉPARATION DE LA FSH

## A - PREPARATION DES POUDRES ACETONIQUES ET BUTANOLIQUES

### I - TRAITEMENT DES SOLVANTS

**L'acétone** : avant la distillation, on laisse l'acétone pendant 24 heures sur du permanganate de potassium à raison de 2 g par litre.

L'acétone, après utilisation pour le traitement des glandes, peut être récupérée dans les conditions suivantes :

a) passage sur une colonne de charbon végétal. Le charbon a été traité au préalable par l'acide acétique, puis lavé à l'eau jusqu'à neutralité ;

b) distillation faite ensuite sur du carbonate de potassium à raison de 1 g par litre. Ce carbonate est conservé dans un dessiccateur après calcination de 20 minutes.

**Le butanol** : il doit être de synthèse (Usines de Melle) et il est seulement distillé.

**L'éther** : est redistillé sur du sulfate ferreux afin de détruire les peroxydes.

### II - PREPARATION DE LA POUDRE ACETONIQUE D'ANTEHYPOPHYSES
(Pour 1 kg de glandes fraîches)

Les antéhypophyses de mouton sont broyées, à peine décongelées en présence d'un peu d'acétone refroidie à -15°C pendant 10 minutes environ. La pâte obtenue est versée au fur et à mesure du broyage dans l'acétone refroidie à -10°C. On emploie au total 10 litres d'acétone par kg de glandes. Le mélange est agité pendant deux heures, en maintenant la température à -10°C.

On filtre sur un büchner en chambre froide. On essore au maximum et on lave par un litre d'acétone propre. Si l'on doit abandonner la préparation à ce stade pour la nuit, il est préférable de laver ensuite par 500 ml d'éther, puis de laisser sécher sur un papier filtre à l'air libre après avoir réduit le gâteau en poudre.

III - PREPARATION DE LA POUDRE BUTANOLIQUE

On peut éviter ce séchage intermédiaire en remettant le gâteau acétonique en suspension dans du butanol à -10°C à raison d'un litre par kg de glandes fraîches. La suspension est agitée pendant une à deux heures, à -10°C. On filtre sur büchner en prenant soin d'éliminer le butanol au maximum. Deux lavages successifs par 1 litre d'acétone sont faits ensuite sur le büchner et on effectue un dernier lavage par 500 ml d'éther. On laisse sécher enfin à l'air libre après avoir réduit le gâteau en poudre.

Le rendement est en moyenne de 240 g de poudre acétonique par kg de glandes fraîches et 220 g de poudre butanolique.

## B - EXTRACTION A PARTIR DE LA POUDRE BUTANOLIQUE PREPARATION D'UN EXTRAIT BRUT

Les 220 g de poudre butanolique séchée sont mis en suspension dans 3 000 ml de solution de sulfate d'ammonium 0,1 M. Quand la totalité de la pâte est en suspension, on ajuste le pH à 8,2 par de l'ammoniaque 6 N. La température pendant toute l'extraction est maintenue à 4°C. On agite alors pendant 6 heures, modérément pour éviter la mousse.

On essore ou on centrifuge. Le résidu est repris dans les mêmes conditions par 1 500 ml de solution de sulfate 0,1 M à pH 8,2 ; on laisse agiter pendant la nuit.

On centrifuge ; les surnageants des deux extractions sont réunis (SI) et le résidu final (RI) est écarté.

## C - FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT BRUT (SI)

### 1er stade

### Précipitation en milieu acide

Par addition d'acide sulfurique 6 N dans le surnageant SI et sous agitation, on abaisse le pH à 5,0 et on laisse reposer la solution au moins 2 heures. On centrifuge et on recueille les fractions suivantes :

RII insoluble, qui est récupéré, dialysé et lyophilisé,

SII surnageant qui contient FSH + LH. Il sera repris au stade suivant.

### 2ème stade

### Fractionnements par le sulfate d'ammonium

Le fraction SII est additionnée lentement et sous agitation de sulfate d'ammonium solide afin d'obtenir une concentration finale de 2,0 M (en tenant compte de la variation de volume due au sel). En fin d'addition le pH est ajusté à 7,0. On l'abandonne pendant la nuit. On centrifuge. Le précipité RIII est dialysé et lyophilisé, il contient surtout LH.

Le surnageant SIII est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à la concentration finale de 3,6 M, puis le pH est ajusté à 5,0.

On abandonne pendant la nuit, on centrifuge et on élimine le surnageant.

Le résidu SIII R1 ainsi isolé est repris par 1250 ml d'eau et additionné à nouveau de sulfate d'ammonium solide jusqu'à une concentration de 1,8 M et le pH est ajusté à 4. On abandonne au moins pendant 3 heures. On centrifuge. Le résidu contient LH. Il est écarté.

Le surnageant est porté à la concentration 3,6 M en sulfate d'ammonium à pH 4, puis il est abandonné pendant la nuit. Après centrifugation, le surnageant est éliminé.

Le résidu SIII R3 est repris à nouveau par 900 ml d'eau et le fractionnement par le sulfate d'ammonium est répété dans des conditions identiques à celles du fractionnement précédent. On obtient alors la FSH dans le précipité SIII R5.

Il est à noter que la plupart des centrifugations peuvent être évitées, la décantation étant possible sauf dans le cas de SIII S1. Par contre, malgré différentes tentatives, nous n'avons jamais pu utiliser la filtration, tous les modèles de filtres s'étant colmatés rapidement.

Enfin, les temps d'évolution des précipités aux différents stades doivent être respectés comme nous avons pu l'observer au cours de la mise au point du procédé.

**3ème stade**

**Fractionnement par l'éthanol en présence d'acétate de zinc**

Le précipité SIII R5 est remis en solution dans 150 ml d'eau. On ajoute de l'acétate de zinc afin d'obtenir une concentration de 0,005 M en ce sel, puis on ajuste le pH à 6,0 par l'ammoniaque diluée.

Par addition d'alcool absolu préalablement refroidi à -10°C on porte la concentration d'alcool à 45 % dans la solution de protéine. L'addition se fait le plus lentement possible, sous agitation assez rapide, de manière à maintenir la température voisine de -10°C. On laisse entre 2 et 4 heures. On centrifuge. Le résidu est écarté.

Le surnageant est alors additionné d'alcool dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à 80 %. On laisse évoluer pendant la nuit. On centrifuge à -10°C. On obtient le produit Zn R80 (FSH) tandis que le surnageant est écarté.

Le rendement en produit Zn R80 varie de 600 à 800 mg par kg d'antéhypophyses fraîches. L'activité spécifique se situe entre 0,4 et 0,8 unités FSH par mg, les variations étant surtout fonction de la date de prélèvement des glandes.

**- Récupération de la fraction active Zn R80**

a) Lyophilisation :

Si l'on veut obtenir le produit Zn R80 à l'état sec on peut le reprendre par un tampon volatil à pH 5 (acétate de pyridine) et de faible concentration (0,05 M par exemple). Ce résidu est en effet difficilement soluble dans l'eau distillée. Par contre, après remise en solution dans le tampon en question,

on peut encore à ce stade dialyser contre l'eau distillée et lyophiliser sans perdre d'activité.

b) Préparation pour le stade suivant :

Si la fraction Zn R80 doit être utilisée aussitôt pour la chromatographie sur DEAE-cellulose nous procédons de la manière suivante :

Le résidu Zn R80 est repris par une solution d'acétate de pyridine 0,05 M à pH 5. Puis on ajoute du sulfate d'ammonium afin d'obtenir une solution saline à la concentration 3,6 M et à pH 4. On laisse évoluer le précipité de FSH qui se forme pendant 2 à 3 heures puis on centrifuge.

Le résidu obtenu est alors très soluble dans l'eau, ce qui nous permet d'avoir toute la fraction Zn R80 dans un faible volume de solution, que l'on peut dialyser d'abord contre l'eau, ensuite contre le tampon Tris-HCl 0,008 N, pH 7,3 jusqu'à ce qu'elle soit équilibrée en vue de la chromatographie au stade suivant.

**4ème stade**

**Chromatographie sur DEAE-cellulose**

La fraction Zn R80 traitée comme ci-dessus est chromatographiée sur cet échangeur d'anions équilibré avec le tampon Tris-HCl 0,008 N, pH 7,3 dans les conditions suivantes :

La solution de protéine (environ 40 ml) est introduite sur la colonne (Voir dimensions pages 41), puis cette dernière est rincée par environ 20 ml de tampon Tris-HCl 0,008 N, pH 7,3. On fait une première élution (Voir fig. 9) par une solution 0,04 M en chlorure de sodium dans le tampon Tris-HCl d'origine. Les protéines non retenues sur la colonne sont écartées.

Quand la densité optique à 280 mμ de l'éluat a atteint une valeur constante après la sortie de la première fraction, on verse sur la colonne une solution 0,1 M de chlorure de sodium dans le tampon Tris précédent.

La fraction éluée dans ces conditions contient l'activité FSH. Cette fraction appelée "De" est collectée suivant les indications de la figure 9.

L'élution est ensuite poursuivie par de la soude 0,2 N puis, après lavage à l'eau, la colonne, équilibrée à nouveau par le tampon Tris-HCl 0,008 N, est prête pour une nouvelle opération.

On obtient à ce stade à partir de 1 kg de glandes 40 à 50 mg de protéine dont l'activité spécifique varie de 4 à 8 unités par mg, soit environ 400 unités de FSH.

Le rendement en activité au cours de la chromatographie est de 75 à 80 %.

Les fractions voisines de ce pic contiennent encore de l'activité mais, comme on a pu le voir, celle-ci est difficilement récupérable.

**-Récupération de la fraction "De"**

a) Préparation du produit lyophilisé :

Tout au début de ce travail, nous avons dialysé et lyophilisé cette fraction. Mais les études de stabilité nous ont montré qu'une préparation de FSH d'activité voisine de 10 unités par mg était partiellement dénaturée par ce procédé, aussi avons nous utilisé la méthode suivante :

La solution de la fraction "De" est additionnée de sulfate d'ammonium jusqu'à la concentration 3,6 M à pH 4. On laisse évoluer le précipité 2 à 3 heures, puis on centrifuge. Le résidu est repris par le tampon acétate de pyridine 0,05 M à pH 5, et introduit dans un sac de collodion. Grâce à un dispositif(*) qui permet de faire le vide à l'extérieur du sac, on peut concentrer rapidement la solution de la protéine. On peut ensuite dialyser la solution concentrée contre le tampon acétate de pyridine pour éliminer complètement le sulfate d'ammonium et lyophiliser en présence de ce tampon volatil. On évite ainsi la dialyse contre l'eau qui est toujours dénaturante à ce stade.

b) Préparation de la fraction "De" pour le stade suivant :

La protéine est récupérée comme ci-dessus par précipitation au sulfate d'ammonium, puis reprise par le tampon acétate de pyridine et dialysée contre ce même tampon.

Elle est enfin concentrée, grâce au sac de collodion, au maximum pour être introduite sur la colonne de Sephadex.

**5ème stade**

**Filtration sur Sephadex G 100**

La fraction "De" ainsi concentrée dans environ 0,1 à 0,2 ml de tampon acétate de pyridine est introduite sur la colonne de Sephadex G 100 préparée comme il a été dit page 51.

La colonne est lavée ensuite par le tampon acétate de pyridine 0,05 M à pH 5 qui a servi à équilibrer le Séphadex. Le débit doit être faible, de 5 à 6 ml par heure pour ce type d'expérience.

A la sortie de la colonne, on recueille des fractions de 2 ml. Par mesure de la densité optique à 280 mμ, on peut tracer le diagramme d'élution de la protéine. Enfin, les dosages biologiques effectués sur ces tubes permettent de placer sur ce même diagramme la courbe d'activité.

Les tubes d'activité voisine sont réunis suivant les indications de la figure 18.

La fraction intéressante contient environ 80 % de l'activité introduite sur la colonne. Les deux fractions voisines, moins actives et représentant les 20 % d'activité restante, peuvent être recyclées.

On obtient en moyenne une FSH titrant 25 à 30 unités FSH par mg, appelée Fraction "Sx". Si cette activité n'est pas atteinte dans une première filtration, on peut repasser sur la même colonne de Séphadex la fraction la plus active, après toutefois l'avoir concentrée à 0,1 ou 0,2 ml après chaque filtration. Le rendement pondéral est de 5 à 10 mg, suivant le nombre de filtrations nécessaires pour obtenir la FSH d'activité maximum.

**- Récupération et conservation de la FSH "Sx"**

La fraction ainsi obtenue par filtration sur Sephadex est concentrée dans le sac de collodion afin d'obtenir une solution de concentration maximum en protéine.

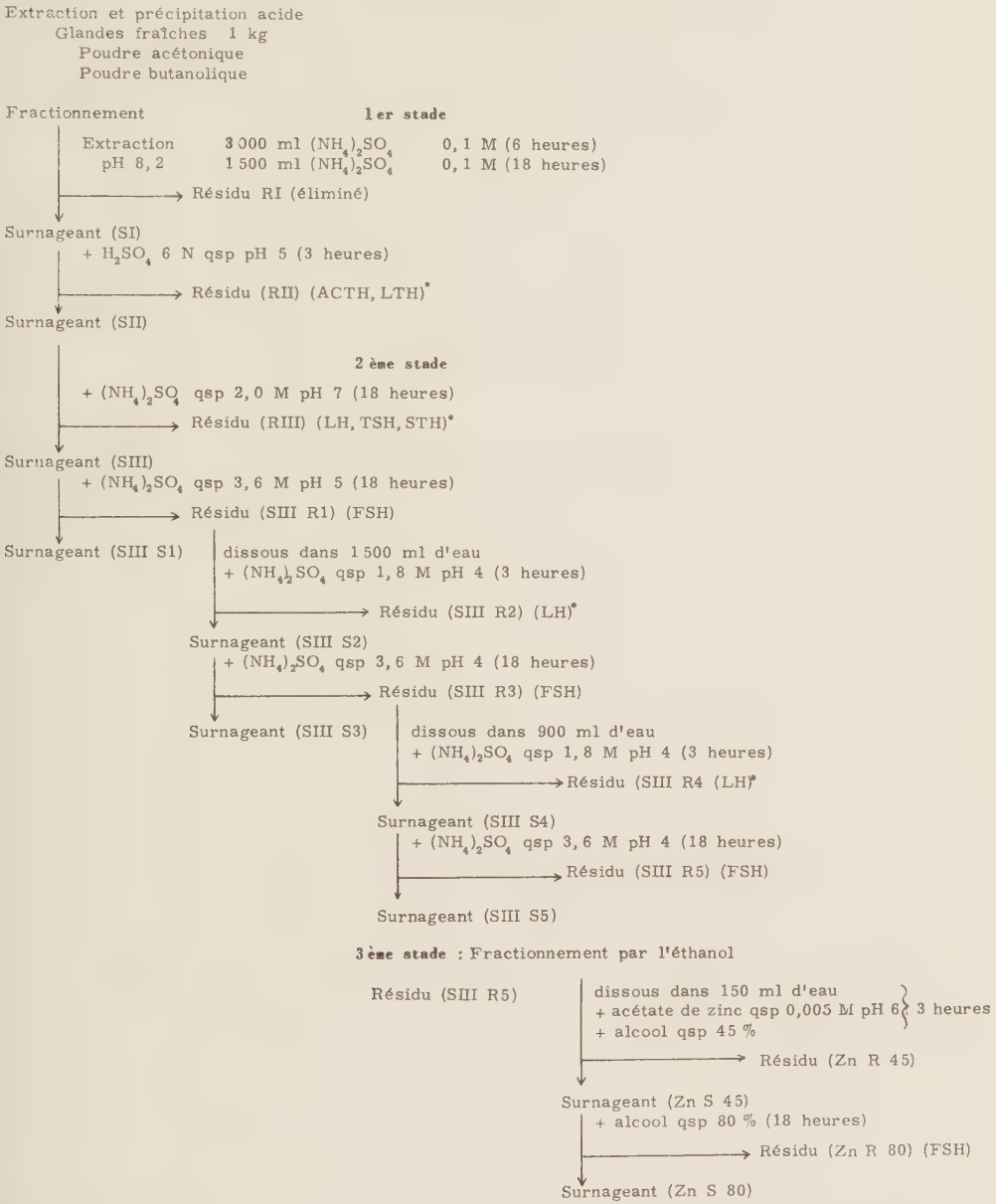
---

(*) Matériel vendu par "MEMBRAN FILTER" à Göttingen (Allemagne).

## Tableau XV

### Schéma de préparation

### de la FSH à partir de 1 kg d'antéhypophyses de mouton




**4ème stade** : Chromatographie sur DEAE-cellulose de Zn R 80. L'activité FSH est comprise dans la fraction F3a (voir fig. 9), désignée comme fraction "De".

**5ème stade** : Filtration sur Sephadex G-100 de la fraction "De". L'activité FSH est comprise dans la fraction centrale désignée comme fraction "Sx".

---

* D'après ELLIS (36).

Afin d'éviter la lyophilisation -toujours dangereuse à ce stade- nous préférons conserver la FSH sous le plus faible volume possible au sein de l'acétate de pyridine dans le sac de collodion où elle a été concentrée. Nous faisons les prises d'essais en diluant cette solution dans le même tampon, l'évaluation de la concentration étant faite par la densité optique à 280 mμ.

L'ensemble de toute la préparation est donné dans les Tableaux XV et XVI avec les rendements en poids et en activité obtenus à chaque stade.

Tableau XVI

Bilan en poids et en activité FSH d'une préparation effectuée sur 1 kg d'antéhypophyses de mouton (Les chiffres indiqués proviennent de plusieurs préparations)

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129)
Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Fractions | Poids recueilli en g | Dose totale injectée mg | Activité | | | Purification** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | U/mg | U/fractions | Rendement % | |
| Poudre acétonique | 220 à 240 | | | | | 1 |
| Poudre butanolique | 210 à 220 | | | | | |
| Surnageant SI* | 25 à 30 | 2 à 4 | 0,02 à 0,03 | 600 à 700 | 100 | 8 |
| " SII* | 18 à 22 | | | | | |
| Résidu RII | 8 à 12 | 4 | 0 | - | | |
| " RIII | 5 à 8 | 4 | 0 | - | | |
| " SIIIR1 | 5 à 6 | 1 | 0,1 | 500 à 600 | 85 | 35 |
| " SIIIR2 | 3 à 4 | 1 | 0,04 | 150 | | |
| " SIIIR3 | 1 à 2 | 0,5 | 0,25 | 250 à 500 | 64 | 98 |
| " SIIIR4 | 0,5 | 0,5 | 0 | - | | |
| " SIIIR5 | 1 à 1,5 | 0,2 - 0,4 | 0,3 | 400 | 60 | 110 |
| Zn R45 | 0,2 | 0,2 | 0 | - | | |
| Zn R80 | 0,6 à 0,8 | 0,15 - 0,30 | 0,4 à 0,8 | 400 | 60 | 197 |
| FSH "De" | 0,04 | 0,015-0,030 | 6 à 8 | 300 | 46 | 2645 |
| FSH "Sx" | 0,005 à 0,010 | 0,003-0,006 | 25 à 30 | 200 à 250 | 35 | 10730 |

* Cette valeur représente le poids de la protéine soluble après dialyse ; l'évaluation est faite à partir d'une prise d'essai.

** Calculée par la relation : (Poids de la fraction/Poids de la poudre acétonique) × Rendement en activité.

CHAPITRE V

# ÉTUDE DE L'HOMOGÉNÉITÉ DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET DE LA STABILITÉ DE LA FSH

## A - ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENT DE SACCHAROSE - DETERMINATION DE LA CONSTANTE DE SEDIMENTATION ET DU POIDS MOLECULAIRE

Cette méthode permet d'étudier l'homogénéité des fractions protéiques obtenues au cours de la purification. On peut aussi, par comparaison avec des protéines dont la constante de sédimentation est connue, obtenir avec une bonne approximation la constante de sédimentation et, partant, le poids moléculaire de la protéine étudiée.

L'avantage du procédé est qu'il s'effectue sur des quantités faibles de protéines, environ 2 à 3 mg.

Nous nous sommes inspirés dans ce travail de l'article de MARTIN et AMES (96). Ces auteurs ont transposé à l'étude des protéines une méthode qui a permis de séparer des constituants cellulaires et d'en déterminer la constante de sédimentation.

### 1/ Principe et mode opératoire

Le rotor à godets oscillants SW 39 de l'ultracentrifugeuse préparative SPINCO, modèle L, est utilisé dans ce procédé. Il donne la possibilité d'étudier 3 échantillons simultanément. Nous pouvons comparer, soit les produits issus de 3 stades d'une purification, soit la protéine étudiée, à deux protéines dont les constantes sont connues. Dans chaque tube de centrifugeuse, nous faisons un gradient de saccharose allant de 20 % à 5 % de bas en haut du tube. Ce gradient est réalisé par un appareil mélangeur du type de celui qui est schématisé dans la figure 25 et dont le volume par cylindre est de 2,5 ml. L'écoulement des solutions doit se faire en 15 à 20 minutes, en commençant par la solution la plus concentrée. Ces solutions doivent être mises en chambre froide quelques heures avant la préparation du gradient pour obtenir l'équilibre de la température. Le saccharose est dissous dans le tampon choisi, en général le tampon Tris-HCl 0,05 N à pH 7,5.

Puis, les gradients étant réalisés, on dissout les échantillons de protéine dans 0,1 ml exactement de tampon pH 7,5, et, grâce à une pipette à pointe recourbée, on dépose ces 0,1 ml de solution à la surface de chaque tube, avec beaucoup de précaution afin que la solution de protéine forme une couche mince. La centrifugation est ensuite mise en marche en prenant soin de faire démarrer le rotor de la centrifugeuse très lentement pour ne pas perturber les gradients.

Le temps de centrifugation se compose du temps réel à la vitesse choisie auquel s'ajoute un temps fictif qui représente en général 5 à 6 minutes pour les deux opérations d'accélération et de décélération. Le tube de centrifugation est alors sorti du rotor puis, grâce à un dispositif destiné à fractionner la solution, le gradient est réparti dans 46 à 47 tubes d'environ 0,1 ml par comptage des gouttes. On détermine ensuite la concentration en protéine (par le réactif de Folin) et l'activité biologique des fractions ainsi recueillies, et l'on construit le diagramme correspondant à ces données.

La distance parcourue dans le tube par la protéine depuis la surface libre où elle a été déposée étant en première approximation fonction de sa constante de sédimentation, on voit ainsi la possibilité de déterminer une valeur approchée de celle-ci.

2/ **Résultats obtenus**

Le temps de centrifugation dans nos expériences est de 20 heures. La vitesse de 40 000 tours par minute (soit des accélérations de 70 000 à 173 000 g) est atteinte en 2 à 3 minutes, tandis que la décélération se fait en 3 à 4 minutes. Enfin la température est de 0°C.

*1ère Expèrience*

Dans une première expérience, nous avons comparé trois fractions issues de 3 stades différents de la préparation de la FSH (fig. 23) :

Tube I FSH après la DEAE-cellulose (4 mg H De 42 F3a)

Tube II FSH après un passage sur Sephadex G 100 (3 mg H Sx120 F1)

Tube III FSH après 3 passages sur Sephadex G 100 (4 mg H Sx133 F1)

L'étude des positions relatives du pic d'activité biologique et du pic de protéine (densité optique) nous conduit aux conclusions suivantes :

- au stade DEAE-cellulose la FSH est encore fortement contaminée par des protéines inactives ;

- après un passage sur Sephadex la plus grande partie de ces contaminants est écartée ;

- après 3 passages sur Sephadex la coïncidence des 2 pics de densité optique et d'activité indique que le produit a atteint un degré de pureté élevé.

*2ème expérience*

Une fraction issue des 3 filtrations sur Sephadex a été soumise à une centrifugation en même temps que deux échantillons aux constantes de sédimentation connues :

Tube I Lysozyme(*) (2 mg)

Tube II FSH après 3 passages sur Sephadex (4 mg HSx133 F1)

Tube III Ovomucoïde(**) (2 mg)

Les conditions sont les mêmes que dans la première expérience.

Les résultats des mesures de densité optique et d'activité biologique sont réunis dans la figure 24.

---

(*) Le lysozyme extrait du blanc d'oeuf est une préparation du laboratoire Armour.

(**) L'ovomucoïde a été préparé par M. J. LEGAULT-DEMARE suivant la technique décrite par M. JUTISZ et Coll. (68).

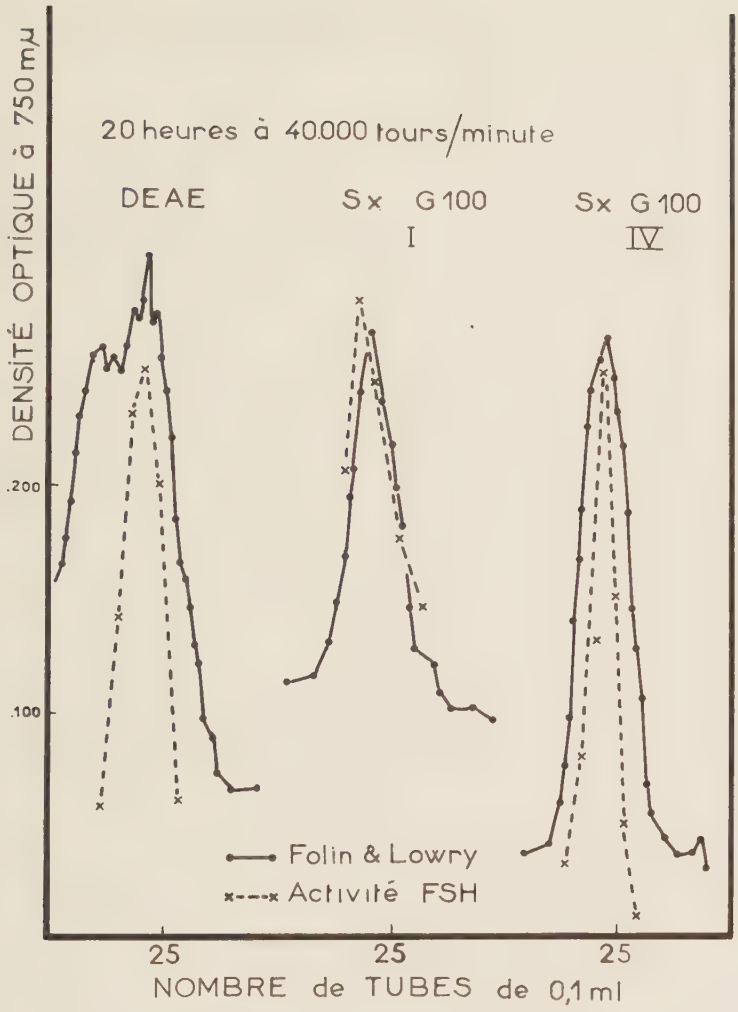



Fig. 23 - Ultracentrifugation dans un gradient de saccharose.

Cette expérience nous permet de calculer les valeurs de la constante de sédimentation et du poids moléculaire de la FSH.

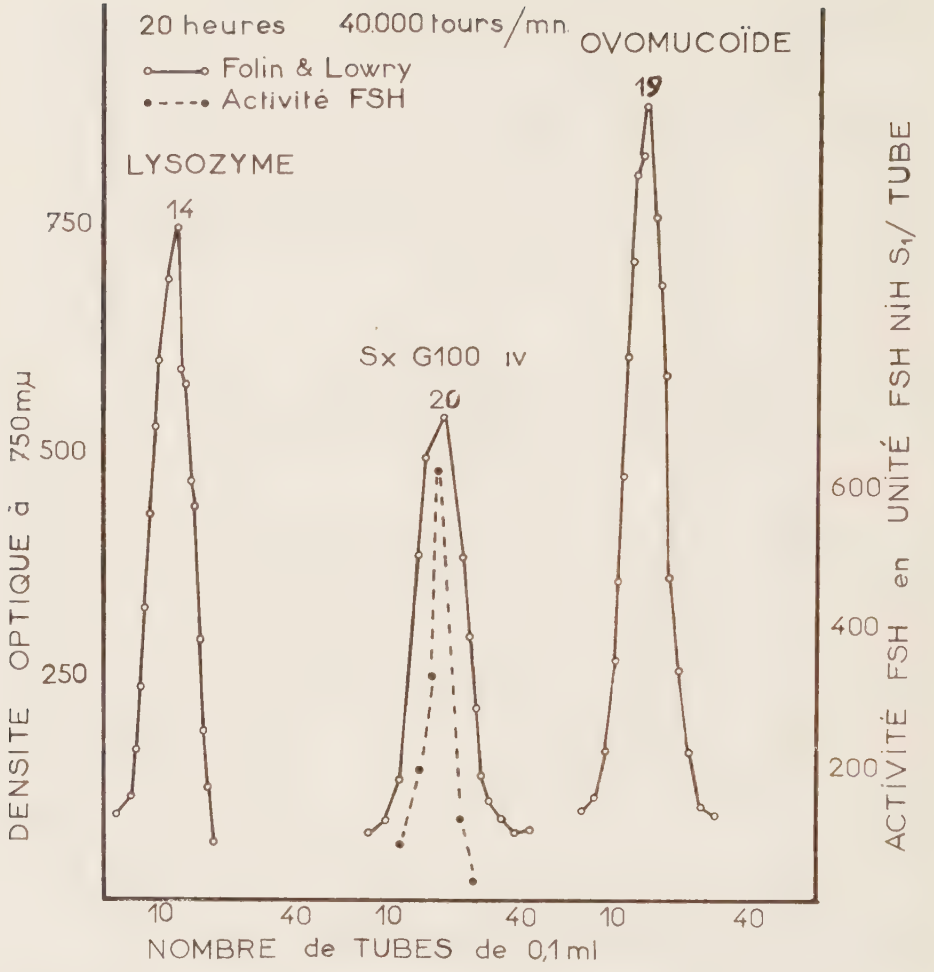



Fig. 24 - Ultracentrifugation dans un gradient de saccharose.

3/ **Calcul de la constante de sédimentation et du poids moléculaire de la FSH**

Les relations utilisées par MARTIN et AMES (96) sont les suivantes :

a) Détermination de la constante de sédimentation $S_{20-w}$ :

Il faut calculer d'abord le rapport R par la relation

$$R = \frac{\text{distance parcourue par la protéine inconnue depuis la surface}}{\text{distance parcourue par la protéine connue depuis la surface}}$$

Si l'on suppose que ces protéines ont le même volume spécifique partiel, on peut écrire :

$$R = \frac{S_{20-w} \text{ de l'inconnue}}{S_{20-w} \text{ de la protéine connue}}$$

ou

$$S_{20-w} \text{ inconnue} = S_{20-w} \text{ connue} \times R$$

Il suffit donc de mesurer sur le diagramme la distance parcourue par chacun des échantillons pour avoir, par cette relation, la valeur de $S_{20-w}$, soit 3,0S pour la FSH. (Voir Tableau XVII).

Tableau XVII

Détermination de la constante de sédimentation $S_{20-w}$ et du poids moléculaire de la FSH par ultracentrifugation dans un gradient de saccharose

| Protéine | Fraction du pic | $S_{20-w}$ | P. M. |
|---|---|---|---|
| Lysozyme | 14 | 2,1 | 14 900 |
| Ovomucoïde | 18 - 19 | 2,8 | 28 000 |
| FSH (Fraction Sx) | 20 | 3,0 | 31 000 |

Le lysozyme et l'ovomucoïde servent de protéines étalons Les distances respectivement parcourues sont définies ici par le n° de la fraction qui présente la densité optique maximale (Résultats de plusieurs essais)

b) Détermination d'une valeur approchée du poids moléculaire :

La relation utilisée par les auteurs est la suivante :

$$\frac{S_1}{S_2} = \left[\frac{PM_1}{PM_2}\right]^{2/3}$$

où $S_1$ est la constante de sédimentation d'un produit I qui peut être déterminée comme ci-dessus,

$PM_1$ son poids moléculaire inconnu
et $S_2$ et $PM_2$ les constantes d'un produit 2 dont les valeurs sont connues.

Les résultats des calculs sont donnés dans le Tableau XVII et le PM de la FSH se trouve être voisin de 30 000 à 31 000.

Cette méthode présente le gros avantage d'employer très peu de produit, ce qui est appréciable en raison des rendements faibles en fraction hautement purifiée. Cependant, elle reste approximative quant à la détermination du poids moléculaire vu la précision de la détermination de la distance parcourue dans le tube du gradient. Elle ne tient pas compte non plus des formes respectives des molécules, facteur qui peut modifier les constantes.

## B - METHODE DE CONDENSATION ISOELECTRIQUE - DETERMINATION DU pH ISOELECTRIQUE

### 1/ Principe

Le procédé appliqué ici est dû à SVENSSON (137). Il consiste à faire une électrolyse dans un tube vertical (fig. 25) au sein d'une solution aqueuse de saccharose contenant un mélange d'ampholytes servant de transporteurs d'ions. La solution de saccharose est introduite dans le tube sous forme d'un gradient de concentration destiné à stabiliser le gradient de pH qui va se constituer pendant l'électrolyse.

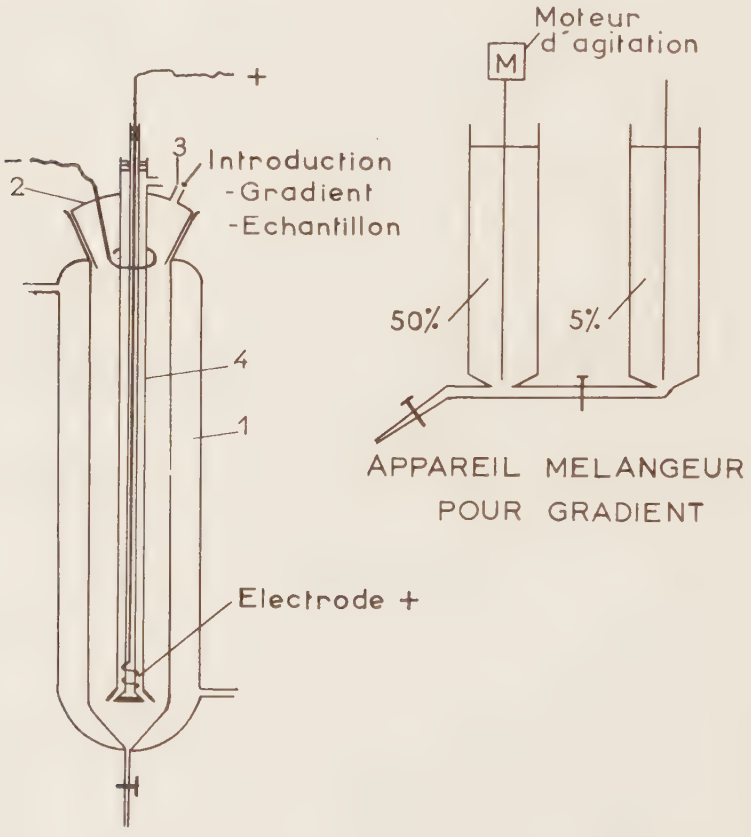



Fig. 25 - Appareil pour condensation isoélectrique.

Si l'on fait une électrolyse dans ce mélange, les ampholytes qui sont répartis dans la solution d'une manière homogène au début de l'expérience, vont être soumis aux forces osmotiques et aux forces électriques. Ces dernières, dues principalement au champ électrique créé par les électrodes placées aux deux extrémités du tube, vont entraîner une migration de ces ampholytes qui vont se placer à un niveau correspondant à leur pH isoélectriques respectifs.

A ce stade, la résultante des forces qui leur sont appliquées devient nulle et le milieu se stabilise. Il en résultera, le long du tube d'expérience, un gradient de pH constitué par la succession des pH isoélectriques des différents constituants. Ce gradient sera facilement mis en évidence en fractionnant le liquide et en mesurant le pH de chaque fraction.

La protéine inconnue, suivant la même loi, se placera à son pH isoélectrique et il suffira, pour déterminer sa position dans le gradient -et partant son point isoélectrique- de l'identifier par un dosage spécifique.

Il faut que les ampholytes transporteurs soient de bas poids moléculaire. Ils doivent aussi avoir un bon pouvoir tampon à leur point isoélectrique.

Les mélanges d'ampholytes sont préparés au laboratoire de la manière suivante :

a) A partir du plasma de cheval :

Le plasma de cheval est obtenu en mélangeant avec 100 ml d'oxalate de sodium 0,11 N un litre de sang et en centrifugeant à 2 500 tours par minute pendant une heure pour enlever les hématies.

Le surnageant est alors dialysé pour éliminer complètement les sels. 200 ml de cette solution, après dialyse, sont amenés à pH 2 et additionnés de 300 mg de pepsine recristallisée ; puis le mélange est remis dans un boyau de cellophane et dialysé contre deux litres de solution d'acide chlorhydrique 0,01 N à pH 2.

Au cours de cette opération, qui se fait dans un thermostat à 37°C, la digestion enzymatique entraine la formation de peptides de bas poids moléculaire qui dialysent. Ils seront récupérés par lyophilisation des dialysats . Cette digestion est faite pendant 48 heures.

b) A partir de la caséine :

Le procédé est similaire, mais la caséine étant difficilement soluble à pH 2 est d'abord dissoute à pH 8, puis dialysée à ce pH. Elle est enfin amenée à pH 2 par HCl, et l'insoluble formé à ce pH est redissous par chauffage à 37°C. On introduit alors la pepsine à raison de 3 g pour 50 g de caséine et on remet le boyau en dialyse contre deux litres de HCl 0,01 N, pH 2, à 37°C pendant 48 heures. Le dialysat obtenu contient les peptides de faible poids moléculaire qui résultent de l'hydrolyse enzymatique. Ils sont récupérés par lyophilisation.

2/ **Appareil d'électrolyse**

L'appareil (fig. 25) est formé :

- d'un cylindre à électrolyse (1) muni d'un robinet à sa partie inférieure, permettant de fractionner la solution en fin d'expérience. Ce cylindre comporte une double enveloppe pour thermostatiser à 0°C ;

- d'un bouchon (2) qui se place à la partie supérieure du cylindre . Ce bouchon possède :

. un fil de platine qui sert d'électrode négative

. une ouverture latérale (3) qui permet le départ du dégagement gazeux de la cathode, l'introduction du gradient de saccharose, l'introduction de l'échantillon de protéine

. un tube de verre (4) qui plonge dans la solution d'électrolyse et par où passe l'anode formée d'un fil de platine noyé dans une baguette en verre. Le fil de platine ressort de la baguette à son extrémité inférieure. Cette extrémité porte de plus un renflement entouré d'un bout de caoutchouc destiné à fermer le tube (4) à sa base, en fin d'expérience pour retenir la solution qu'il renferme. Cette solution, en effet, a été perturbée pendant toute l'électrolyse par le dégagement gazeux qui se produit sur l'électrode. Grâce à ce dispositif, le gradient compris entre les tubes (1) et (4) ne subit aucun brassage.

3/ **Mode opératoire**

a) Préparation du gradient :

Le gradient est réalisé, dans le petit appareil schématisé sur la figure 25, avec 65 ml de solution à 50 % de saccharose et 65 ml de solution à 5 % de saccharose dans laquelle ont été dissous 3 à 5 g de dialysat pepsique de plasma de cheval.

Le gradient s'écoule dans l'appareil à électrolyse, le tube central (4) de l'anode étant en position ouverte.

b) Introduction de l'échantillon :

Quand le gradient est arrivé au niveau désiré dans l'appareil à électrolyse, on arrête quelques instants son écoulement pour introduire la protéine à étudier. Celle-ci est dissoute dans la solution de gradient qui s'écoule à ce moment (prélevée dans l'appareil mélangeur). La solution de protéine est ensuite introduite dans l'appareil à électrolyse à l'aide d'un tube capillaire Puis l'écoulement du gradient est achevé.

c) Electrolyse :

Quand l'équilibre de température à l'intérieur du tube est atteint, le montage est mis sous tension. En général, l'intensité monte dans les dix premières minutes, se stabilise, puis décroit assez vite dans la première heure.

L'expérience se termine quand l'intensité est voisine de zéro (en général 2 à 3 mA, pendant plusieurs heures), la migration des ampholytes étant achevée.

En fin d'expérience, la communication entre l'anode et la solution est fermée et le courant est coupé. Puis on fait écouler aussitôt la solution par le robinet en recueillant des fractions de 2 ml.

Les déterminations de concentration de protéine, d'activité biologique et de pH sont faites sur ces fractions. Il existe cependant une difficulté pour déterminer la position de la protéine car les peptides servant d'ampholytes présentent en général une absorption à 280 mμ, d'où l'impossibilité d'utiliser la densité optique. Des essais de dialyse effectuée sur chacune des fractions afin d'éliminer ces peptides n'ont pas donné les résultats escomptés, une partie importante des ampholytes ne dialysant pas dans ces conditions. On ne peut donc utiliser cette méthode comme critère de pureté.

4/ **Résultats**

Une expérience est effectuée sur une fraction issue du Sephadex G 100 (H Sx 124 F1) dont l'activité est de 16,45 unités par mg. Le mélange d'ampholytes est constitué par 3 g de dialysat pepsique de plasma de cheval.

La protéine est introduite au niveau correspondant au tube 37 (Voir fig. 26).

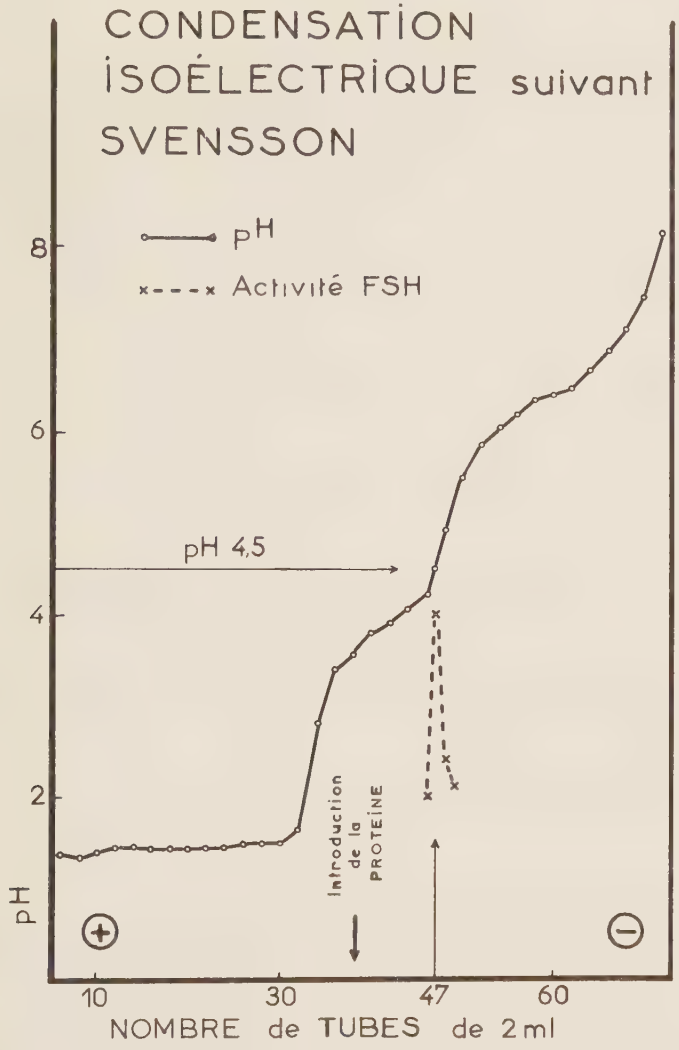



Fig. 26 - Détermination du pHi sur sur fraction "Sx".

Le voltage est de 500 volts et l'intensité, dont le maximum est de 60 mA, se stabilise en fin d'expérience à 3 mA. Le fractionnement est fait après 24 heures d'électrolyse. Les résultats sont rapportés dans la figure26.

On voit que le maximum d'activité biologique est atteint dans le tube 47, ce qui correspond à un pH isoélectrique de 4,4 à 4,5.

## C - ETUDES ELECTROPHORETIQUES DE LA FSH PREPAREE PAR FILTRATION SUR GEL SEPHADEX G 100

### I - ELECTROPHORESE SUR COLONNE DE PEVIKON

#### 1/ Essai dans le tampon Tris-HCl 0,05 N a pH 8,15

Le procédé d'électrophorèse décrit page 59 a été utilisé pour étudier l'homogénéité des fractions issues du Sephadex G 100. L'essai E1 P19 est fait à pH 8,15 dans un tampon Tris-HCl 0,05 N. L'anode est en bas de la colonne. La protéine, 56 mg de la fraction H Sx 100-19 F1, migre entièrement vers l'anode. La récupération en densité optique est de 97 %. La figure 27 représente le diagramme de cette opération réalisée sous 500 volts et 8 mA pendant 48 heures. Un seul pic de protéine est présent, mais le pic d'activité est décalé par rapport à celui des densités optiques. L'activité spécifique est, au départ, de 19,2 unités par mg, soit 1075 unités au total.

On ne récupère en activité que 380 unités, soit environ 35 %, l'activité moyenne se situant aux environs de 25 unités par mg.

Nous avons donc ici encore une perte considérable d'activité sans purification appréciable.

Une seconde électrophorèse est réalisée sur 13 mg de la fraction active (E1 P19 F1) récupérée après cette première électrophorèse. Les conditions restent les mêmes.

Nous constatons (fig. 28) que le pic d'activité est à nouveau retardé par rapport au pic de protéine, le maximum d'activité étant placé sur le diagramme à la même position que dans le premier essai.

Après regroupement des tubes contenant l'activité, nous obtenons 2 mg d'une FSH titrant 30 à 40 unités par mg (E1 P20 F1). Le rendement en activité est alors de 25 % par rapport à la fraction E1 P19 F1, donc comparable à celui de la première opération.

Nous en concluons que dans toutes ces électrophorèses de zone la fraction FSH se dénature fortement. On note cependant une certaine purification de la fraction active.

#### 2/ Essai avec un tampon plus concentré (E1 P21)

Afin d'étudier plus en détail les causes possibles de cette dénaturation, nous avons essayé d'employer un tampon 4 fois plus concentré. Le même support est utilisé, mais équilibré avec le tampon Tris-HCl 0,2 N, pH 8,1.

La fraction protéique est une fraction issue du Sephadex (H Sx 120 F1) de 10 mg, soit environ 200 U. NIH. L'électrophorèse est faite toujours sous 500 volts pendant 48 heures ; l'intensité est en revanche ici de 26 mA. L'échauffement n'est cependant pas appréciable, l'ensemble du montage étant en chambre froide.

On constate que la courbe d'élution (fig. 29) est légèrement plus symétrique. La récupération en poids des protéines est totale :

E1 P21 F1 6,5 mg d'activité nulle,
E1 P21 F2 3,5 mg d'activité spécifique 15 unités/mg soit 52,5 unités au total, ce qui représente 26 % de l'activité introduite.

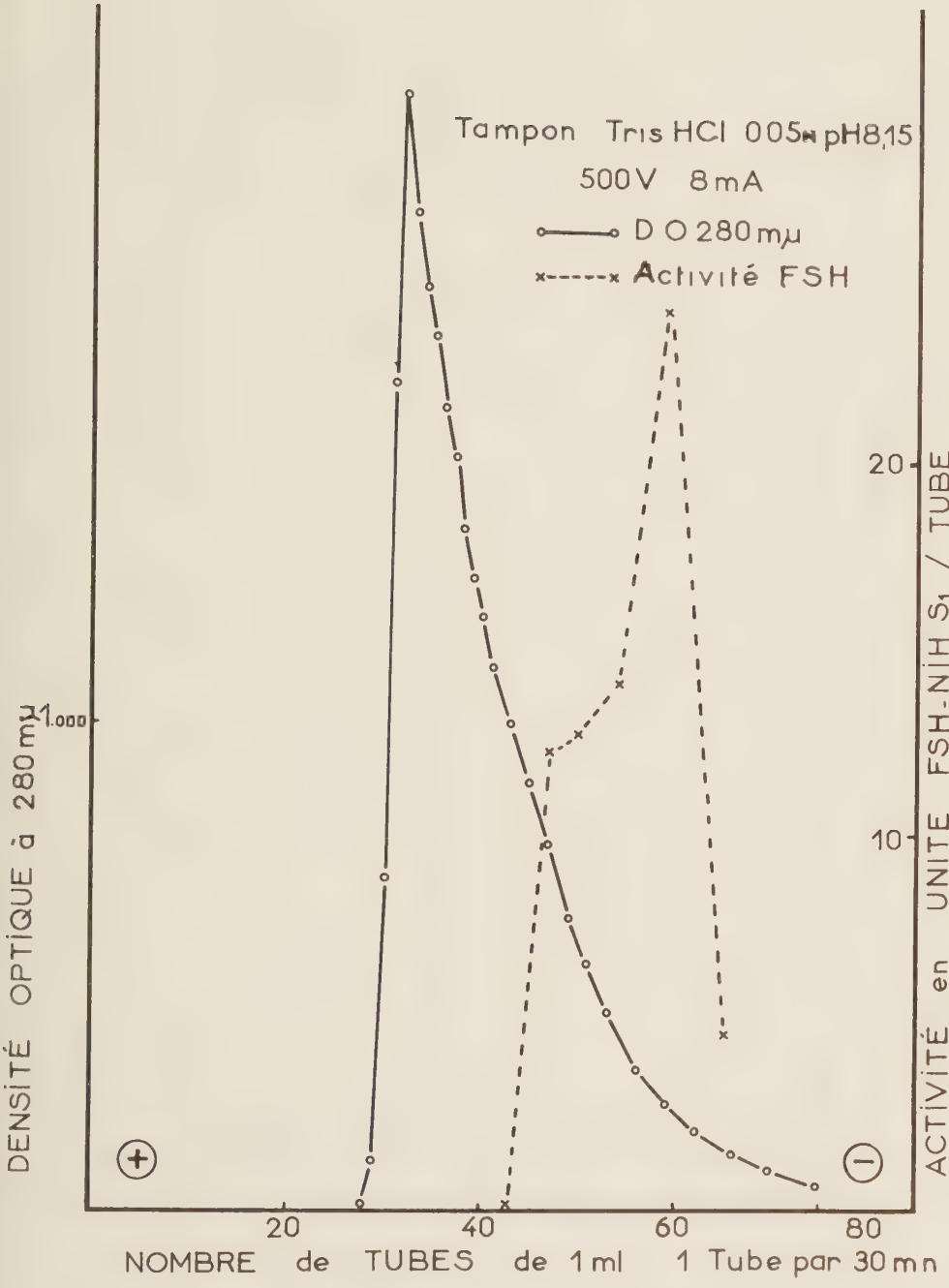



Fig. 27 - Electrophorèse sur pevikon.

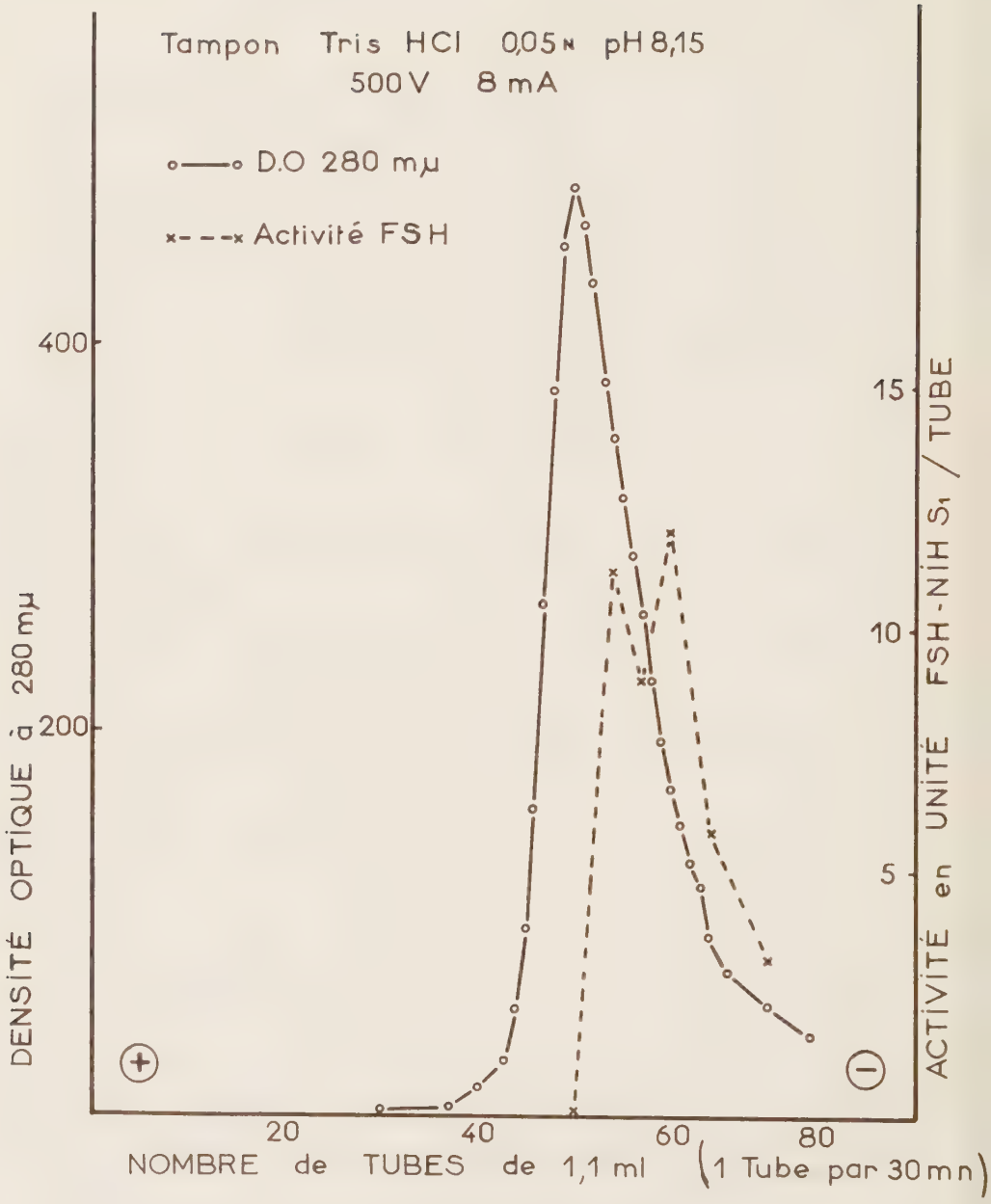



Fig. 28 - Re-Electrophorèse de la fraction FSH active obtenue précédemment (fig. 27)

Par conséquent, la dénaturation est toujours aussi forte.

Une autre hypothèse en dehors de la dénaturation est encore possible. On peut supposer que la fraction F1 est constituée par un facteur qui potentialise l'activité contenue dans F2. Il nous faut, pour le vérifier, doser chaque fraction séparément, ainsi que le mélange des 2 fractions dans les proportions qui reconstituent le produit initial. Si l'hypothèse est exacte, le mélange deux fractions doit avoir le même activité que la FSH de départ.

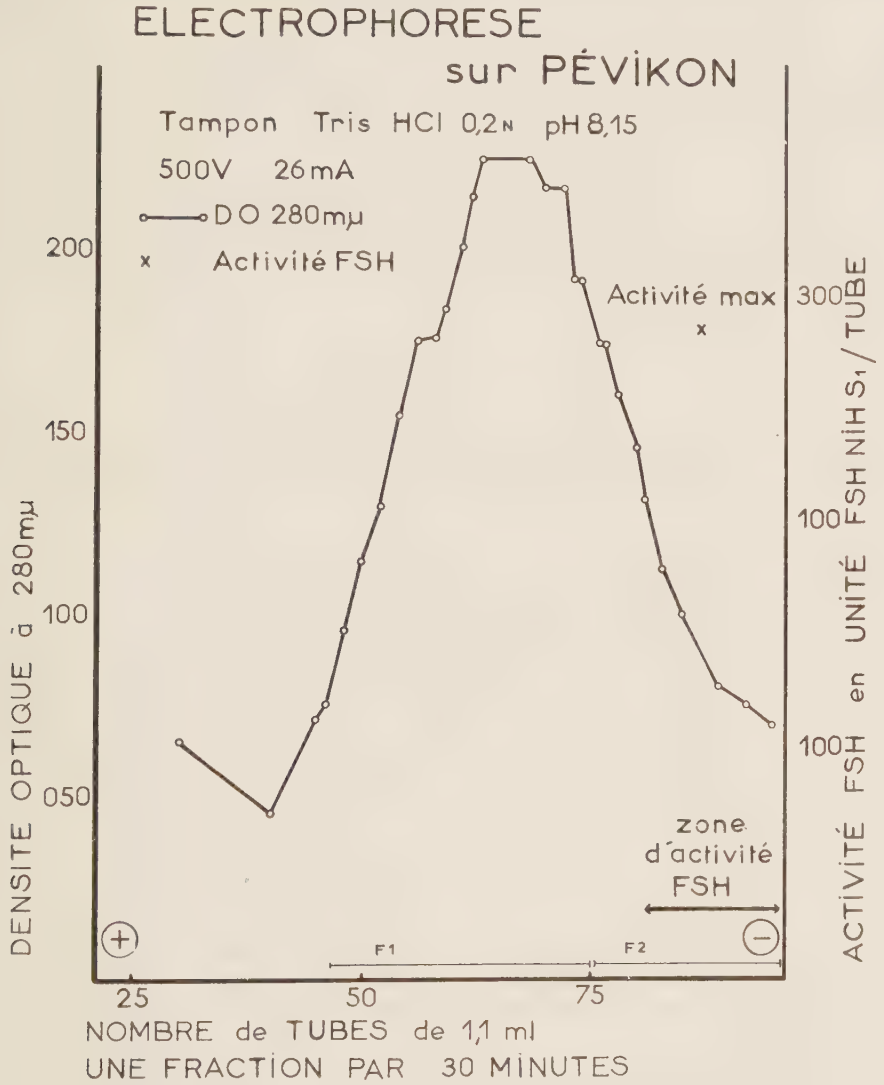



Fig. 29 - Electrophorèse d'une fraction issue du Sephadex G 100.

D'après le Tableau XVIII, nous voyons que F1 est inactif et que F2 est actif. Quant au mélange F1 + F2 il ne possède plus d'activité aux doses où le produit de départ était actif. Il nous faut donc conclure qu'il y a bien eu dénaturation.

## II - ELECTROPHORESE SUR COLONNE DE SEPHADEX

Cette recherche des causes de perte d'activité nous a également amené à changer de support. En effet, le Pevikon pouvait être responsable de la dénaturation de la FSH par effet de surface.

Sachant d'autre part que l'activité était parfaitement stable sur Gel Sephadex, nous avons pensé que ce produit pourrait nous servir de support pour l'électrophorèse. La colonne a les mêmes dimensions que la précédente. Nous utilisons le tampon Tris-HCl 0,05 N, pH 8,15 et comme conditions d'électrophorèse : 500 volts et 10 mA. La protéine est la même que ci-dessus, soit 17 mg de H Sx 120 F1. Ici, la dénaturation a été pratiquement totale et la récupération en protéines de 20 % après dialyse.

Par conséquent, nous voyons que l'introduction d'un champ électrique -même avec ce support sur lequel la FSH est stable- entraîne une dénaturation importante. Cette dénaturation semble due à un effet de surface dans toutes ces électrophorèses de zone car, au cours de la condensation isoélectrique, où la protéine migre en veine liquide, on a pu récupérer la quasi-totalité de l'activité biologique.

## III - ELECTROPHORESE DE ZONE SUR RIGOLE D'AMIDON

Nous avons repris la technique d'électrophorèse en rigole d'amidon de pomme de terre appliquée à la PMSG par LEGAULT-DEMARE et Coll. (74).

Tableau XVIII

Répartition de l'activité FSH dans les fractions d'une électrophorèse (El P21) sur Pevikon (voir fig. 29)
Dosage biologique de la FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

| | Poids mg | Dose totale injectée µg | Nombre de Rats | Moyenne de poids des ovaires en mg avec erreur type |
|---|---|---|---|---|
| Produit de départ (HSx120 $F_1$) | 10 | 5 | 5 | 65,54 ± 6,61 |
| | | 10 | 5 | 127,21 ± 3,94 |
| Tubes 47 à 75 ($F_1$) | 6,5 | 10 | 5 | 41,36 ± 3,01 |
| | | 20 | 5 | 41,70 ± 3,70 |
| Tubes 76 à 96 ($F_2$) | 3,5 | 5 | 5 | 60,40 ± 7,86 |
| | | 10 | 5 | 132,70 ± 14,26 |
| Mélange $F_1 + F_2$ (mêmes proportions que le produit de départ) | - | 5 | 5 | 43,51 ± 3,96 |
| | | 10 | 5 | 48,49 ± 3,08 |
| Témoins (NaCl) | - | - | 5 | 41,40 ± 1,44 |

L'électrophorèse est faite dans le tampon Tris-HCl 0,1 N, pH 8,2.

L'amidon, mis à gonfler une nuit dans le tampon, est ensuite coulé dans une rigole en plexiglas de 230 x 23 x 4 mm. Puis on effectue une élec-

trophorèse de 2 à 3 heures sous 2 volts par cm avant d'introduire l'échantillon de protéine dans une petite cuvette entaillée dans la masse d'amidon. La protéine est introduite dans l'appareil, mélangée à de l'amidon en quantité nécessaire pour remplir cette petite cuvette.

L'électrophorèse est faite pendant 20 heures sous une tension de 6 volts par cm. En fin d'expérience, l'amidon est découpé en 23 tranches de 1 cm, et chaque tranche est éluée 2 fois par mise en suspension de l'amidon dans le tampon et décantation de l'extrait.

La solution recueillie est étudiée par coloration au Folin (voir page 97) et l'activité biologique FSH est déterminée par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129). On n'obtient (fig. 30) qu'un seul pic de protéine, non homogène, et l'activité, comme on peut le voir, est dans la fraction la moins électro-négative (2 ème partie du pic). Ce résultat est analogue à celui obtenu par l'électrophorèse sur Pevikon. Le rendement en activité est d'environ 33 % .

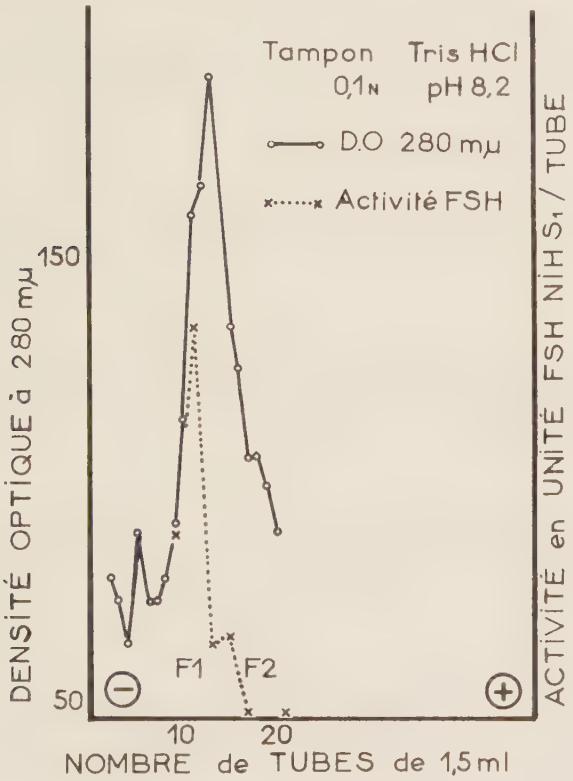



Fig. 30 - Electrophorèse sur Amidon d'une fraction FSH issue de la filtration sur Sephadex G 100.

Pour conclure toutes ces études faites par électrophorèse de zone, nous pouvons dire que, dans tous les cas, nous avons constaté une perte d'activité supérieure ou égale à 70 %. L'isolement d'un facteur potentialisant la fraction active étant exclue, il nous faut admettre une dénaturation très importante de la FSH par cette méthode.

Ce critère de pureté se trouve donc exclu pour l'étude de la FSH.

Ces résultats concernant la perte d'activité biologique concordent avec les essais d'électrophorèse effectués par d'autres auteurs sur la FSH de mouton, en particulier C.H. LI (113) et McSHAN (120).

## D - ETUDES DE LA STABILITE BIOLOGIQUE DE LA FSH

Les études de stabilité ont été faites sur une FSH hautement purifiée (Fraction Sx). Cette fraction purifiée s'est révélée particulièrement fragile, comme nous allons le voir, aussi il nous a paru utile de préciser les facteurs responsables d'une dénaturation.

L'activité biologique des produits à doser est évaluée dans toutes ces études par la méthode de STEELMAN et POHLEY. (129) La FSH à doser est dissoute dans du sérum physiologique additionné de serumalbumine à la concentration de 0,5 %. Ce sont là des conditions favorables au maintien de l'activité biologique, comme on pourra le voir au paragraphe correspondant.

### I - EFFET DE LA DILUTION DANS L'EAU

La fraction "Sx" utilisée dans cette étude a une activité de 22,45 unités FSH par mg. Elle a été dosée après lyophilisation. Trois essais sont effectués :

**1er essai**

Une prise d'essai est dissoute dans l'eau à une concentration de 100 µg par ml. Puis les dosages sont préparés à partir de cette dilution de la manière décrite ci-dessus.

**2ème essai**

Une autre prise d'essai est dissoute dans l'eau comme dans le premier essai, puis cette solution est lyophilisée. On redissout alors la poudre obtenue, toujours à la même concentration. Enfin, on prépare les dosages de la manière habituelle.

**3ème essai**

Une dernière prise d'essai de FSH toujours dissoute dans l'eau à la même concentration est dialysée pendant 24 heures. Les dosages sont ensuite préparés à partir de cette solution, de la même manière que ci-dessus.

Les résultats des différents dosages sont donnés dans le Tableau XIX.

Nous voyons d'après ce Tableau, que la dissolution dans l'eau entraîne une perte d'activité de 50 % au moins.

Le second essai conduit à penser que ce produit, déjà partiellement dénaturé, est relativement stable puisqu'une lyophilisation et une seconde dissolution n'entraînent pas de nouvelle perte d'activité.

Par contre, un séjour prolongé dans l'eau, ce qui est la cas de la dialyse, diminue encore l'activité FSH par rapport au premier essai.

Tableau XIX

Stabilité en solution aqueuse d'un échantillon de FSH (HSx 115 $F_1$) (voir conditions page 84)

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129)

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$

| Essai | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | e %(*) | λ(**) |
|---|---|---|---|
| FSH (dissous NaCl + serumalbumine) | 22,45 (12,00 - 41,98) | 34,3 | 0,19 |
| 1 er essai (dissolution $H_2O$) | 9,84 (6,92 - 13,99) | 18,0 | 0,14 |
| 2 ème essai (dissolution $H_2O$ lyophilis). | 10,49 (5,80 - 18,98) | 31,2 | 0,23 |
| 3 ème essai (dialyse $H_2O$ après dissolution) | 6,19 (3,77 - 10,13) | 25,4 | 0,16 |

(*) Pourcentage d'erreur de l'étalonnage : e % = (antilog. SM × 100) - 100

(**) Indice de précision : λ

Tableau XX

Stabilité d'un échantillon de FSH (HSx 115 $F_1$) en présence de serumalbumine

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129)

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| FSH dissoute dans NaCl + Serumalbumine | 22,45 (12,00 - 41,98) | 34,34 | 0,19 |
| FSH dissoute dans NaCl | 19,38 (11,34 - 33,12) | 28,77 | 0,18 |

Il en résulte que, au-delà du stade d'un produit titrant 5 à 6 unités par mg, la dissolution dans l'eau est à éliminer et, avec elle, toutes les opérations qui s'y rattachent. La dialyse contre l'eau, entre autres, n'est plus possible. Il faudra conserver le produit obtenu en solution saline. Certains tampons, comme l'acétate de pyridine par exemple, permettent de conserver l'activité dans un milieu favorable. On peut en outre obtenir la FSH lyophilisée directement à partir de cette solution, ce tampon étant volatil. Donc, dès le stade de la DEAE-cellulose (fraction "De"), nous avons sup-

primé la dialyse. Pour la même raison, la déminéralisation par le Sephadex G 25 équilibré par l'eau a dû être abandonnée.

Nous préférons aujourd'hui utiliser un sac de collodion (voir page 66) avec le tampon acétate de pyridine pour :

1/ concentrer les fractions actives

2/ échanger les tampons par dialyse

3/ conserver directement la FSH en solution extrêmement concentrée en évitant ainsi la lyophilisation.

## II - EFFET DE LA DILUTION EN SOLUTION PHYSIOLOGIQUE, OU EN SOLUTION DE SERUMALBUMINE

L'augmentation de l'activité spécifique des produits isolés exige pour les dosages, la préparation de solutions à une très grande dilution. C'est ainsi que nous injectons des solutions contenant moins de 1 µg de FSH par ml. Nous avons alors recherché si l'activité restait stable dans de telles conditions.

La première protection est évidemment celle qui résulte de l'emploi de la solution physiologique comme on l'a constaté dans le Tableau XX.

Dans le cas où des dilutions intermédiaires sont nécessaires, il faut aussi se souvenir que l'eau, même pour quelques instants, est à proscrire.

Nous avons essayé aussi de mieux protéger l'activité en ajoutant à la solution à doser une quantité constante de sérumalbumine (sol. à 0,5 %). Il semble, d'après le Tableau XX que cette addition améliore la stabilité du produit. La sérumalbumine est ajoutée actuellement de façon systématique dans tous les échantillons à doser.

## III - EFFET DE LA PERVAPORATION ET DE LA LYOPHILISATION

Un premier moyen de concentrer la solution de protéine a été de pervaporer celle-ci à 0°C dans un boyau de cellophane en milieu acétate de pyridine. Nous avons alors dosé l'activité dans la solution avant et après cette opération, et il semble d'après le Tableau XXI que nous n'ayons pas de perte d'activité.

Ce procédé avait l'inconvénient d'être long. Nous préférons actuellement la concentration en sac de collodion (Voir stabilité en fonction du temps).

Pour obtenir le produit sec, nous reprenons alors cette solution concentrée en milieu acétate de pyridine, et nous lyophilisons en très peu de temps. Il est ainsi possible d'obtenir un produit titrant 22 à 25 unités FSH par mg sans dénaturation. Il est à remarquer que, parfois, ce produit lyophilisé est difficile à remettre en solution d'acétate de pyridine. On peut alors centrifuger pour écarter un faible insoluble. Il n'en résulte aucune perte d'activité appréciable.

Enfin, tous les tampons volatils ne semblent pas convenir puisque, d'après le Tableau XXI, la lyophilisation dans le tampon bicarbonate d'am-

monium entraîne une perte importante d'activité. On peut dire, en conclusion, qu'il est préférable d'éviter, à ce stade, la lyophilisation. Si l'on veut absolument lyophiliser, il faut concentrer la protéine au maximum en milieu acétate de pyridine pour n'avoir à lyophiliser qu'un volume très réduit, en présence de ce tampon volatil.

## IV - EFFET DE LA TEMPERATURE

Nous avons déjà mentionné quelques études faites sur la résistance de la FSH à la chaleur.

En effet Mc SHAN et MEYER (93), au cours de la purification de la FSH sont amenés à chauffer leurs extraits bruts pour détruire l'activité enzymatique résiduelle. Après digestion en présence de trypsine, ils chauffent ces extraits à 75°C pendant 20 minutes sans perte d'activité.

Plus tard, les mêmes auteurs extraient la FSH par chauffage à 72°C pendant une heure et en solution saturée de chlorure de sodium. On ne peut évidemment ici savoir quelle est la perte d'activité due à ce traitement.

Il faut remarquer cependant que, plus le produit est brut, meilleure est sa stabilité.

- Chauffage à 37°C pendant 24 h à pH 8,2 tampon Tris-HCl 0,1 M

Cette étude de stabilité de la FSH a été effectuée au cours des digestions trypsiques. Une première expérience est rapportée dans le Tableau XXVIII.

Par comparaison des essais $T_{II}$ et $T_{III}$, on peut conclure que pour cette fraction d'activité 11,67 unités FSH par mg, il n'y a aucune dénaturation dans ce milieu. De même, d'après l'essai (T24) rapporté dans le Tableau XXVIII, où cette même fraction de FSH est traitée pendant 24 heures par la trypsine à 37°C et à pH 8, on voit qu'il n'y a aucune perte d'activité à cette température. Par suite, on peut dire que, pour une fraction titrant 12 unités FSH par mg, il n'y a aucune perte d'activité dans ces conditions expérimentales.

## V - EFFET DU pH

L'étude des effets de ce facteur a été faite à 37°C. Trois valeurs de pH ont été étudiées. Nous avons choisi les tampons suivants :

pH 10 : Glycocolle-soude 0,1 M

pH 5 : Acétate de pyridine 0,1 M

pH 3 : Glycocolle-acide chlorhydrique 0,1 M

La FSH dissoute dans ces tampons a été maintenue au thermostat à 37°C pendant 24 heures.

Les résultats des dosages biologiques sont donnés dans le Tableau XXII.

On voit qu'à pH 3 la destruction est pratiquement totale, tandis qu'à partir de pH 5 jusqu'à pH 10 la stabilité de cette fraction Sx est très bonne.

Tableau XXI

Stabilité d'un échantillon de FSH après pervaporation et lyophilisation.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129)

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$ .

| Essai | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| FSH dissous dans NaCl + serumelbumine | 21,93 (10,87 – 44,29) | 39,29 | 0,21 |
| Echantillons pervaporé en milieu acétate de pyridine | 18,04 (10,81 – 30,09) | 27,28 | 0,18 |
| Echantillon lyophilisé en présence de bicarbonate d'ammonium | 6,94 (4,72 – 10,20) | 19,93 | 0,16 |

Tableau XXII

Stabilité de la FSH (HSx128 $F_2$ ) à 37°C pendant 24 heures en fonction du pH.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129)

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| FSH étudiée | 24,23 (17,37 – 33,80) | 17,00 | 0,15 |
| " à pH 3 | Destruction > 80 % | - | - |
| " à pH 5 | 16,40 (11,05 – 24,33) | 20,45 | 0,18 |
| " à pH 10 | 17,11 (12,73 – 22,99) | 14,96 | 0,13 |

Tableau XXIII

Stabilité de la FSH à 0°C, pH 5 (Acétate de pyridine) en fonction du temps

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129)

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| FSH (HSx128 $F_2$) | 24,23 (17,37 – 33,80) | 17,00 | 0,15 |
| " " après 4 mois | 24,30 (17,07 – 34,65) | 18,21 | 0,16 |

Tableau XXIV

Stabilité de la FSH en milieu saccharose + polypeptides (voir texte)

Dosage biologique de la FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| FSH (HSx121 $F_1$) | 11,67 (7,67 - 17,76) | 21,89 | 0,18 |
| FSH (HSx121 $F_1$) + saccharose + polypeptides | 9,56 (6,12 - 14,92) | 23,39 | 0,19 |

## VI - STABILITE EN FONCTION DU TEMPS

Nous avons vu au paragraphe concernant la lyophilisation que cette opération, qui nous permet classiquement de conserver les protéines à l'état solide, risquait dans le cas de la FSH de détruire en partie l'activité.

Nous avons préféré dès lors concentrer au maximum, dans un sac de collodion, la solution de FSH au sein d'un tampon acétate de pyridine 0,05 M à pH 5,0. Ce procédé présente les avantages suivants :

1/ Commodité de concentration

2/ Conservation facile au voisinage de 0°C, la pyridine évitant la prolifération des micro-organismes

3/ Possibilité de reprendre facilement la FSH, soit pour la lyophilisation (0,1 ou 0,2 ml de solution pour plusieurs mg de FSH), soit pour tout autre étude après échange du tampon à travers la membrane de collodion.

Nous avons alors été amenés à évaluer la perte éventuelle d'activité de la FSH conservée dans ces conditions en fonction du temps. Cette étude faite sur un échantillon qui présente une forte activité nous indique que, même après 4 mois, la stabilité est parfaite (Voir Tableau XXIII).

Cette expérience permet aussi une évaluation de la stabilité de la FSH à pH 5 et à 0°C.

## VII - STABILITE EN SOLUTION DE SACCHAROSE

Pour la détermination du pH isoélectrique, nous utilisons la condensation isoélectrique suivant SVENSSON (Voir page 74). Le milieu d'électrolyse comprenant un mélange d'ampholytes et de saccharose, nous avons recherché la stabilité de la FSH dans un tel milieu faiblement ionisé. Les résultats des dosages, résumés dans le Tableau XXIV nous indiquent que l'activité d'une fraction titrant environ 12 U NIH. FSH. $S_1$ par mg se conserve assez bien dans ces conditions.

## VIII - STABILITE EN SOLUTION DE DETERGENT OU D'UREE

D'après un travail de MEYER et KAUZMAN (97), il y a inversion de la dispersion rotatoire de l'ovalbumine suivant qu'elle est en solution dans l'urée ou dans le dodécyl-sulfate de sodium. Il y a donc une atteinte à la structure physique de la molécule. Afin d'aborder la question des relations entre structure et activité biologique, nous avons voulu savoir quelle serait l'action de ces composés sur l'activité FSH.

a) Cas du dodécyl-sulfate de sodium :

Pour cet essai une fraction FSH "Sx" titrant 15, 50 unités par mg a été utilisée. Cette fraction est dissoute dans une solution à 1 % de dodécyl-sulfate, puis les dosages sont effectués avec les mêmes précautions que d'habitude. La destruction de l'activité biologiques a été totale.

b) Cas de l'urée :

L'action de l'urée 5 M a aussi été déterminée, mais sur une fraction moins purifiée, au stade DEAE-cellulose.

Nous avons dissous dans l'urée 5 M une fraction FSH (H De 31 F3) d'activité spécifique 5, 58 unités FSH par mg, puis nous l'avons abandonnée 48 heures en chambre froide dans cette solution. Les résultats des dosages biologiques sont donnés dans le Tableau XXV. Une fraction possédant cette activité est donc stable dans l'urée. Cette étude est à reprendre sur une fraction plus purifiée.

De la comparaison de ces deux actions -urée et détergent- il semble donc que l'activité biologique soit liée aux structures secondaires de la molécule.

Tableau XXV

Stabilité de l'activité FSH ($HDe_{31}$ $F_3$) dans une solution d'urée 5M

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en unités par mg avec intervalle de confiance pour p = 0, 05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision $\lambda$ |
|---|---|---|---|
| FSH ($HDe_{31}$ $F_3$) | 5, 88 (3, 98 – 7, 83) | 17, 28 | 0, 13 |
| - id - + Urée 5M | 4, 75 (3, 15 – 7, 15) | 21, 31 | 0, 18 |

Tableau XXVI

Action de la cystéine sur l'activité FSH (HSx115 $F_1$) (voir conditions dans le texte)

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en unités par mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| FSH non traitée | 9,84 (6,92 – 13,99) | 18,08 | 0,14 |
| FSH traitée par la cystéine | 8,06 (5,02 – 13,72) | 25,12 | 0,21 |

## IX - STABILITE A L'ACTION D'UN REDUCTEUR MODERE

L'effet d'un milieu réducteur sur l'activité FSH a été étudiée par l'addition d'une solution de cystéine à la concentration de 150 µg par ml. 300 µg de FSH (HSx 115 F1) dissous dans 1 ml de tampon acétate de pyridine 0,1 M à pH 5, sont additionnés d'un ml de solution de cystéine. On laisse le mélange à 37°C pendant 30 minutes, puis on prépare les solutions de dosage de la manière habituelle.

L'activité biologique de la FSH, au départ, était de 9,84 unités FSH par mg.

Après cette action, la FSH a conservé 82 % de son activité biologique. (Voir Tableau XXVI).

## X - ACTION DU DFP (DI-ISOPROPYLFLUOROPHOSPHATE) (63)

L'étude de la résistance de la FSH à l'action de la trypsine nécessite, en fin de digestion, un blocage de l'activité enzymatique. Ce blocage, on le verra, peut être fait par l'ovomucoïde qui se révèle sans action sur l'activité biologique ; seulement, nous introduisons là des traces de protéine qui peuvent être gênantes pour les opérations qui suivent.

On a donc essayé aussi le DFP pour bloquer l'activité trypsique. Ce blocage s'effectue par phosphorylation de l'hydroxyle de la molécule de serine du centre actif (33) de l'enzyme.

Il fallait cependant vérifier que l'activité biologique FSH n'était pas touchée. L'essai a été fait sur un produit partiellement purifié ayant une activité de 7,8 unités FSH par mg. (Tableau XXVII).

La concentration de DFP à utiliser a été déterminée en admettant qu'il n'existerait qu'une seule serine entrant dans la réaction, par molécule de trypsine.

Tableau XXVII

Action du di-isopropylfluorophosphate sur l'activité de la FSH (voir conditions dans le texte)

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en unités par mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| FSH (HSx122 $F_1$) | 7,81 (5,03 – 12,11) | 21,89 | 0,18 |
| - id - + DFP | 6,57 (3,60 – 11,90) | 32,75 | 0,23 |

Afin d'être assuré de bloquer la réaction enzymatique, nous avons employé une quantité de DFP dix fois plus grande, soit 10 molécules de DFP par molécule de trypsine.

## XI - ACTION DE LA TRYPSINE

L'activité FSH résiste à l'action de la trypsine. Cette résistance a été reconnue depuis très longtemps. Dès 1939, en effet, CHOW et Coll. (21), étudiant l'action de différentes enzymes protéolytiques, montraient que la trypsine détruisait l'activité LH sans toucher à l'activité FSH.

D'autres auteurs se sont servi d'ailleurs de cette dissociation d'action de la trypsine pour essayer d'éliminer l'activité LH dans les préparations de FSH. Ce fut le cas de McSHAN et MEYER en 1939 (92) qui l'utilisent sur la FSH de mouton. De même, plus tard, STEELMAN et Coll. (136) se servent de la pancréatine pour purifier la FSH de porc. Mais ces études ayant été faites, soit au stade de l'extraction, soit à un stade de purification peu avancé, nous les avons reprises sur une fraction "Sx" plus purifiée et nous avons déterminé, grâce à la méthode de PARLOW, la quantité de LH détruite par digestion enzymatique.

### 1/ **Résistance a la trypsine - Résultats obtenue pour FSH**

L'étude de la stabilité de la FSH incubée en présence de la trypsine a été faite sur une fraction issue du sephadex G 100, ayant une activité de 12 unités FSH par mg.

Cette fraction a été mise en solution dans le tampon Tris-HCl 0,1 N, pH 8,2, tampon qui est suffisant pour assurer la stabilité de l'activité FSH.

D'autre part, la trypsine, ainsi que l'ovomucoïde qui sert à bloquer l'activité enzymatique, sont dissous dans le même tampon. On réalise ainsi des conditions de pH favorables à la digestion. La température est de 37°C et les temps sont variables pour déterminer la durée optimum de la réaction enzymatique.

La solution de FSH est répartie en tubes d'égales quantités. Trois témoins sont prévus :

$T_I$ : renfermant seulement la FSH

$T_{II}$ : comprenant la FSH, l'ovomucoïde et la trypsine afin de déterminer :

- l'action de ces deux protéines sur l'activité biologique

- l'absorption totale des protéines en réaction colorimétrique. L'addition de l'ovomucoïde avant la trypsine bloque immédiatement l'activité de celle-ci.

$T_{III}$ : ayant la même composition que $T_{II}$, mais maintenu à 37°C pendant le temps maximum d'étude de la digestion enzymatique, pour apprécier l'effet de la température sur l'activité dans ce milieu.

Les essais soumis à la digestion enzymatique comportent : 4 tubes ($T_2$, $T_4$, $T_8$, $T_{24}$). Chaque tube est additionné au temps 0 de la quantité de trypsine requise (1/50 en poids), puis le tube est placé au bain-marie à 37°C pendant 2, 4, 8, 24 heures. Après ces temps, on ajoute une quantité d'ovomucoïde égale à 10 fois celle de la trypsine ajoutée, puis on conserve à 2 ou 3°C jusqu'aux dosages biologiques.

Les dosages colorimétriques sont effectués par la méthode à la ninhydrine (voir page 97). Les résultats sont donnés dans le Tableau XXVIII.

On peut en tirer les conclusions suivantes :

- L'addition de l'ovomucoïde et de la trypsine n'entraîne pas de modifications de l'activité biologique.

- L'effet de la température entraîne une faible baisse de l'activité (11,6 à 9,34 unités FSH par mg), mais qui n'est pas statistiquement significative.

- La résistance de la FSH à l'action de la trypsine est totale, même après 24 heures de digestion.

- Enfin, l'étude de la coloration à la ninhydrine nous montre que les coupures qui peuvent se faire sont maximums après deux heures déjà.

D'autres essais ont donné les mêmes résultats que celui-ci.

2/ **Destruction de LH par la trypsine**

Cette étude a été faite sur le standard LH. NIH. $S_3$. Les conditions de la digestion trypsique sont les suivantes :

Rapport enzyme-substrat : 1/50

pH : 8,2 par un tampon Tris-HCl 0,1 N

Température d'incubation : 37°C

Temps de digestion : 23 heures.

Le blocage de l'activité enzymatique est effectué par l'ovomucoïde (10 fois la quantité de trypsine pure utilisée). Les dosages de l'activité LH se font par la méthode de PARLOW (Voir page 27). L'analyse statistique nous indique que, dans ces conditions et sur ce produit LH. NIH. $S_3$, la destruction de l'activité LH est de 99 %. (Tableau XXIX).

Tableau XXVIII

Action de la trypsine (E/S = 1/50, 37°C, pH 8,2) sur l'activité FSH (HSx 121 $F_1$) pendant des temps variables.

Dosage biologique de l'activité FSH par la méthode STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Essai | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ | Do Ninhydrine × 1000 |
|---|---|---|---|---|
| $T_I$ (FSH) | 11,67 (7,67 - 17,76) | 21,89 | 0,18 | 640 |
| $T_{II}$ (FSH + ovomucoïde + Trypsine) | 11,46 (5,83 - 14,89) | 13,03 | 0,11 | 840 |
| $T_{III}$ (FSH + ovomucoïde + Trypsine à 37°C, 24 h) | 9,34 (6,56 - 13,30) | 18,16 | 0,15 | 800 |
| T 2 heures de digestion | 7,33 (5,51 - 9,91) | 14,84 | 0,13 | 1020 |
| T 4 " | Non significatif | | | 1015 |
| T 8 " | 9,20 (6,37 - 13,27) | 18,88 | 0,16 | 1020 |
| T 24 " | 9,49 (6,62 - 13,60) | 18,51 | 0,16 | 1040 |
| T 24 " | 12,07 (7,14 - 20,40) | 28,11 | 0,23 | - |

Tableau XXIX

Action de la trypsine (E/S = 1/50, 37°C, pH 8,2) sur la LH (LH. NIH. $S_3$)

Dosage biologique de l'activité LH par la méthode de PARLOW (103)

Activité exprimée en unités LH. NIH. $S_3$.

| | Rapport des activités après traitement avec limite de confiance pour p = 0,05 | Pourcentage d'erreur e % | Indice de précision λ |
|---|---|---|---|
| 1 er essai | 0,012 (0,023 - 0,065) | 47,72 | 0,35 |
| 2 ème essai | 0,013 (0,020 - 0,085) | 35,75 | 0,39 |

3/ **Action de la trypsine sur une fraction "Sx" : Dosages FSH et LH**

Ayant montré la stabilité totale de l'activité FSH d'une fraction "Sx" et la destruction à 99 % de l'activité LH dans l'étalon LH. NIH. $S_3$, nous avons essayé de déterminer l'activité LH résiduelle dans le produit "Sx" ayant subi une digestion en présence de trypsine.

A cet effet, nous avons utilisé une fraction "Sx" dont l'activité FSH était de 12 unités par mg, activité qui s'est conservée après digestion trypsique. Nous y avons dosé la LH après cette digestion, par la méthode de PARLOW.

L'activité LH résiduelle est inférieure à 0,001 (comprise entre 0,006 et 0,0001) unités LH. NIH. $S_3$ par mg.

Il ne nous a pas été permis d'atteindre une valeur statistiquement plus précise, vu la quantité importante de la fraction qu'il devient nécessaire d'injecter pour doser ces traces de LH.

On voit donc, en comparant ce dosage à celui donné dans le Tableau XL pour la fraction non digérée, que l'activité LH résiduelle a été diminuée d'environ 75 % par la digestion trypsique.

Le Tableau XXX résume l'ensemble des études faites sur la stabilité de la FSH suivant l'état de pureté de la fraction utilisée.

## E - ETUDES COLORIMETRIQUES DE LA FSH

1/ **Absorption dans l'ultra-violet**

La plupart des protéines incolores en solution sont cependant formées d'un nombre suffisamment grand d'aminoacides aromatiques (tyrosine et tryptophane) pour produire une absorption dans l'ultra-violet (région de 250 à 300 mμ).

Cette absorption est pratiquement indépendante du pH pour le tryptophane et la phénylalanine (9). Par contre, pour la tyrosine, ceci n'est vrai que pour des pH de 1 à 8. Au-delà, et jusqu'à pH 12, l'ionisation variable du groupement hydroxyle phénolique modifie l'absorption de la protéine, pour ces valeurs élevées du pH. L'absorption se déplace vers les longueurs d'onde croissantes, et son intensité augmente. Cette variation peut cependant être réduite si le groupe hydroxyle se trouve protégé par la structure secondaire.

Par conséquent, pour des variations de pH allant de 4 à 9, zone de stabilité de l'activité biologique et pour des forces ioniques faibles, il est possible de définir un coefficient K qui correspond à la densité optique mesurée à 280 mμ, d'une solution de cette protéine à la concentration 0,1 % et sous un trajet optique de 1 cm.

La densité optique peut alors servir à déterminer la concentration de la protéine en solution.

Nous avons fait une telle détermination sur plusieurs fractions à partir du stade de la DEAE-cellulose, soit en solution aqueuse, soit dans l'acétate de pyridine 0,05 M à pH 5.

Pour l = 1 cm, c = 0,1 % en protéine, on trouve à 280 mμ : K = 0,60.

Tableau XXX

Résumé des études sur la stabilité de la FSH.
Dosage biologique de la FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY (129).

Activité exprimée en unités FSH. NIH. $S_1$.

| Facteurs et conditions | Activité en U/mg avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | | % de destruction |
|---|---|---|---|
| | au départ | après action | |
| - Dissolution dans l'eau | 22,45 (12,00 – 41,98) | 9,84 (6,92 – 13,99) | 50 |
| - Dialyse contre l'eau | " " | 6,19 (3,77 – 10,13) | 72 |
| - Serum physiologique | " " | 19,38 (11,34 – 33,12) | stable (*) |
| - Pervaporation (Ac Py) | 21,93 (10,87 – 44,29) | 18,04 (10,81 – 30,09) | stable (*) |
| - Lyophilisation Bicarb. d'ammon. | " " | 6,94 (4,72 – 10,20) | 60 |
| - Température (37°C-24h-pH8) | 11,67 (7,67 – 17,76) | 12,07 (7,14 – 20,40) | stable |
| - pH (24h à 37°C) | | | |
| pH 3 | 24,23 (17,37 – 33,80) | 0 | 100 |
| pH 5 | " " | 16,40 (11,05 – 24,33) | 0 à 30 |
| pH 10 | " " | 17,11 (12,73 – 22,99) | 0 à 25 |
| - Conservation 0°C -4 mois-pH 5 | 24,23 (17,37 – 33,80) | 24,30 (17,04 – 34,65) | stable |
| - Saccharose + polypeptides | 11,67 (7,67 – 17,76) | 9,56 (6,12 – 14,92) | stable (*) |
| - Urée | 5,88 (3,98 – 7,83) | 4,75 (3,15 – 7,15) | stable (*) |
| - Dodecyl-sulfate | 15,50 (8,18 – 29,37) | 0 | 100 |
| - Cystéine | 9,84 (6,92 – 13,99) | 8,06 (5,02 – 13,72) | stable (*) |
| - Trypsine | 11,67 (7,67 – 17,76) | 12,07 (7,14 – 20,40) | stable |

(*) La faible diminution d'activité dans ces cas est difficile à apprécier, le pourcentage d'erreur des dosages étant du même ordre.

2/ **Coloration et dosage par le réactif de Folin** - suivant H. LOWRY et Coll. (89)

Cette réaction des protéines se fait avec le réactif de Folin, comprenant principalement du tungstate et du molybdate de sodium dans l'acide phosphorique. Au moment du dosage, la protéine est mélangée avec une solution cuprique alcaline et le réactif ci-dessus. On laisse ensuite reposer 30 minutes à température ordinaire.

L'intensité de la coloration qui est proportionnelle à la quantité de protéine est déterminée par mesure de densité optique à 500 mμ pour des quantités de 25 à 100 μg et à 750 mμ pour des quantités de 5 à 25 μg de protéines. On rapporte ensuite ces mesures à une courbe d'étalonnage.

3/ **Coloration et dosage par la ninhydrine**

Suivant le procédé de STEIN et MOORE (98), le colorant est formé par une solution de ninhydrine et d'hydrindantine dans un mélange de cellosolve ou methoxy-2 éthanol et de tampon acétate de sodium pH 5, 5.

La coloration proportionnelle à la quantité de protéine présente dans la prise d'essai, additionnée de réactif, se développe par chauffage au bain-marie à 100°C pendant 15 minutes. Les lectures se font à 570 mμ. Cette coloration permet de mettre en évidence des quantités de 100 à 200 μg de protéine.

4/ **Coloration et dosages suivant la méthode de GOA** (51) (121)

Cette méthode est une variante de la réaction du biuret. Elle met en évidence les peptides. Les lectures se font à la longueur d'onde de 330 mμ. Elle ne donne pas de coloration appréciable à moins de 500 μg de FSH par ml.

## F - COMPOSITION CHIMIQUE DE LA FSH(*)

### I - ACIDES AMINES

La composition en acides amines a été établie d'après la technique mise au point par PIEZ et MORRIS (110) sur une fraction de FSH (HSx 128 $F_2$) issue du Sephadex G 100, et d'attivité biologique 24, 3 unités FSH par mg.

L'hydrolyse de la protéine est effectuée par l'acide chlorhydrique 6 N sur 3 échantillons d'environ 300 μg chacun pendant 24, 48 et 72 heures. On peut, grâce à ces 3 essais, suivre pour chaque acide aminé, soit sa libération de la protéine, soit sa destruction, soit la résultante des deux phénomènes qui peuvent être simultanés.

La séparation des divers acides aminés est réalisée par chromatographie sur une résine échangeuse d'ions (Dowex 50 x 12) en utilisant comme éluant un gradient de tampon citrate allant du pH 2, 85 au pH 5. L'étude qualitative et quantitative de cette chromatographie est ensuite réalisée dans l'autoanalyseur Technicon.

Par extrapolation des résultats acquis dans chacun des 3 temps d'hydrolyse, il est possible de connaître le pourcentage réel de chacun des acides aminés au sein de la protéine.

---

(*) Ce travail a été fait en collaboration avec M. P. de la LLOSA.

Le Tableau XXXI résume les résultats de ces 3 expériences et donne le pourcentage et le nombre de résidus de chacun des acides aminés présents dans une molécule de FSH, dont le poids moléculaire a été fixé entre 30 000 et 31 000 par ultracentrifugation.

Tableau XXXI

Composition de la FSH en acides aminés
(HSx 128 $F_2$)

| Acides aminés | % Molécule | % Ac. Am. | R par Moles (30000) |
|---|---|---|---|
| Gly | 1,52 | 2,71 | 8 |
| Ala | 2,60 | 4,65 | 11 |
| Val | 2,64 | 4,71 | 8 |
| Leu | 4,14 | 7,40 | 11 |
| Ileu | 2,26 | 4,03 | 6 |
| Pro | 3,23 | 5,77 | 10 |
| Phe | 2,94 | 5,25 | 6 |
| Tyr | 3,26 | 5,82 | 6 |
| Try | 2,48 | 4,43 | 4 |
| Ser | 3,19 | 5,70 | 11 |
| Thr | 3,70 | 6,61 | 11 |
| Cys | 2,22 | 3,96 | 3 |
| Met | 0,87 | 1,56 | 2 |
| Arg | 2,60 | 4,64 | 5 |
| His | 1,82 | 3,26 | 4 |
| Lys | 5,12 | 9,15 | 12 |
| Asp | 4,94 | 8,82 | 13 |
| Glu | 6,40 | 11,43 | 15 |
| | 55,95 | 99,90 | 146 |

**Détermination de la tryrosine et du tryptophane**

Si la tyrosine peut être déterminée par la méthode précédente, il n'en est pas de même pour le tryptophane qui est détruit au cours de l'hydrolyse acide.

Il est possible, par contre, d'utiliser une propriété particulière à ces acides aminés. Dès 1883 SORET (125) faisait remarquer que l'absorption des solutions de protéines dans l'ultra-violet était due à la présence des amino-

acides aromatiques, tyrosine et tryptophane. Plusieurs méthodes de dosage spectrophotométrique de ces deux constituants découlent de cette propriété. Nous avons appliqué ici l'une d'elles, due à BENCZE et SCHMID (10). Cette méthode nécessite l'étude spectrophotométrique d'une solution de la protéine dans la soude 0,1 N.

Pour l'analyse de notre protéine, nous avons préparé cette solution à partir de 0,95 mg de FSH "Sx" (HSx 128 $F_2$) dissous dans 3 ml de soude 0,1 N. On trace ensuite la courbe d'absorption de cette solution, entre 270 et 300 mμ. La pente de la droite tangente aux deux maximums situés entre 280 et 290 mμ permet, en utilisant des tableaux donnés par les auteurs, de déterminer le rapport Tyr/Try.

La valeur de l'absorption totale donne d'autre part le pourcentage de Tyr + Try. On peut donc obtenir à partir de ces deux données la quantité de chacun de ces amino-acides.

Dans notre cas, nous obtenons un rapport Tyr/Try de 1,53, et un pourcentage de Tyr + Try de 6,5 %. Il en résulte que, pour un poids moléculaire de 30 000, on trouve 6,2 résidus de Tyrosine et 4,1 résidus de Tryptophane.

Cette valeur pour la tyrosine est en accord avec celle déterminée par hydrolyse acide.

## II - DETERMINATION DES EXTREMITES C ET N-TERMINALES

### a) **Extrémité N-terminale**

Pour rechercher la présence éventuelle d'acides aminés N-terminaux libres, nous avons utilisé la méthode de SANGER (119) au moyen du fluorodinitrobenzène (FDNB). L'échantillon de FSH soumis à cette étude est la fraction HSx 128 $F_2$.

Après traitement de la protéine par le FDNP et hydrolyse de la protéine dinitrophénylée, les DNP-amino-acides ont été extraits d'abord par l'éther, ensuite par le butanol, puis chromatographiés en couche mince de cellulose (86). Pour la chromatographie de la phase éthéro-soluble, les solvants suivants sont utilisés

1 ère dimension : butanol secondaire-phtalate 0,05 M à pH 6 (109)
2 ème dimension : phosphate 1,5 M à pH 6 (76)

et pour les produits extraits par le butanol, un mélange d'alcool isoamylique et de tampon phtalate à pH 6 (13) est employé. Seule la ε-mono-DNP-Lysine a été trouvée. Aucun amino-acide N-terminal n'a donc pu être mis en évidence.

### b) **Extrémité C-terminale**

Elle n'a été recherchée que par la carboxypeptidase A (WORTHINGTON).

Les conditions de traitement d'un échantillon de FSH (HSx 122 $F_1$) ont été les suivantes : une suspension de carboxypeptidase est dissoute dans du chlorure de lithium à 10 %, à pH 7,5 (49) et les endopeptidases qui peuvent contaminer le réactif sont inhibées par traitement au di-isopropylfluorophosphate.

2,5 mg de FSH sont dissous dans 1 ml de bicarbonate de sodium à 0,5 % ajusté à pH 8. On ajoute 100 µg de carboxypeptidase et on maintient à 28°C pendant 5 heures. On traite ensuite par le fluorodinitrobenzène pendant 4 heures, puis on acidifie et on centrifuge la DNP-protéine. Enfin, on extrait à l'éther et au butanol et on recherche par chromatographie les DNP-amino-acides, comme dans le cas de l'extrémité N-terminale.

Nous n'avons trouvé aucun amino-acide libéré par cette enzyme. On peut donc penser :

- soit à l'absence d'un acide aminé C-terminal,

- soit à la présence d'un amino-acide C-terminal résistant à l'action de l'enzyme (acide aminé basique, proline),

- soit enfin à un blocage du groupe carboxylique d'un acide aminé C-terminal.

## III - GLUCIDES

### 1/ **Hexoses**

La recherche des glucides a été réalisée sur la même fraction de FSH que pour la tryptophane (HSx 128 $F_1$), et la méthode de LUSTIG et Coll. (90) décrite par WINZLER (144) a été appliquée ici.

Elle consiste à traiter la glycoprotéine par une solution d'acide sulfurique (60 ml d'acide sulfurique concentré, et 40 ml d'eau) à 80°C pendant 15 minutes en présence d'orcinol. On reporte ensuite la valeur de la densité optique obtenue pour cet échantillon sur une courbe d'étalonnage, les mesures étant faites à 540 mµ, afin d'avoir la quantité d'hexoses contenue dans l'échantillon. La courbe d'étalonnage est tracée à partir d'un mélange équimoléculaire de mannose et de galactose.

Le chiffre obtenu pour la FSH est, dans ces conditions, de 12 % d'hexoses.

Deux remarques sont à faire :

1/ Le fucose réagit aussi dans cette expérience. Il a donc été déduit du chiffre donné ci-dessus, son pourcentage ayant été obtenu sur un autre échantillon par un dosage spécifique.

2/ La courbe d'étalonnage varie suivant que l'on dose le galactose, le glucose ou le mannose. Par conséquent, cette valeur de 12 % est une moyenne ; nous n'avons pas pu soumettre -par manque de substance- à une nouvelle analyse plus spécifique une autre fraction purifiée.

Cependant, une chromatographie en couche mince a permis de savoir que le galactose et le mannose se partageaient également la quasi-totalité des hexoses présents. Le glucose existe aussi dans la FSH, mais en quantité plus faible.

### 2/ **Fucose** (Méthylpentoses)

La méthode de DISCHE (32) utilisée est indiquée également dans l'article déjà cité de WINZLER.

L'échantillon est traité par une solution d'acide sulfurique (6 volumes

d'acide concentré et 1 volume d'eau) puis chauffé pendant 3 minutes à l'ébullition. Il est ensuite additionné, après refroidissement, d'une solution de cystéine. La densité optique du mélange est mesurée, après 60 à 90 minutes, aux longueurs d'onde de 396 et de 430 mμ. Une relation donnée par l'auteur permet de connaître directement la quantité de ce glucide à partir des valeurs de densité optique ainsi déterminée.

3/ **Acides sialiques**

Cette appellation a été attribuée à un corps isolé par BLIX en 1936 (15) à partir de la mucine sous-maxillaire de boeuf. Elle englobe différents dérivés de l'acide neuraminique (N-acétyl, N-glycolyl et N-O diacétyl).

Parmi ces méthodes qui permettent de doser ces corps, la technique de WARREN (141) a été retenue ici.

Elle consiste à oxyder, après hydrolyse, le produit à doser par le périodate de sodium en solution dans l'acide phosphorique concentré. Le produit résultant donne, par copulation avec l'acide thiobarbiturique, un composé chromophore qui peut être dosé par colorimétrie. La méthode serait très spécifique d'après l'auteur.

Appliquée à la FSH, elle a conduit à une concentration d'acide sialique d'environ 5 %.

4/ **Hexosamines**

Il est possible d'analyser ces constituants après une hydrolyse acide de la protéine (HCl 2 N, pendant 8 heures à 100°C) en les séparant par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne de 50 cm de longueur, contenant de l'Amberlite IR 120. Le dosage est fait à la ninhydrine dans un autoanalyseur Technicon (126) (106). Cette hydrolyse est plus ménagée que pour l'étude des acides aminés. Dans ces conditions, deux pics sont caractéristiques des hexosamines.

Il a été possible, dans le cas de la FSH, de mettre en évidence l'absence de galactosamine et la présence de 9 % de glucosamine (11 % sous forme d'acétyl-glucosamine).

L'ensemble de tous ces résultats est donné dans le Tableau XXXII.

Tableau XXXII

Constantes physico-chimiques de la FSH

| Données | Valeur | Méthode utilisée |
|---|---|---|
| $S_{20-w}$ (HSx 133 $F_1$) | 3.0 S | MARTIN et AMES (96) |
| P.M. " | 30 000 à 31 000 | MARTIN et AMES (96) |
| PHi (HSx 124 $F_1$) | 4,4 - 4,5 | SVENSSON (137) |
| Aminoacides (HSx 128 $F_2$) | 55,95 % | Autoanalyseur (110) |
| Glucosamine (HSx 133 $F_2$) | 9 % | " |
| Galactosamine (HSx 133 $F_2$) | néant | " |
| Sucres neutres (HSx 128 $F_2$) | | Orcinol (144) |
| Galactose +++<br>Mannose +++<br>Glucose + | 12 à 13 % | |
| Fucose (HSx 128 $F_2$) | 0,5 % | Cystéine (144) |
| Acides sialiques (HSx 133 $F_2$) | 5 % | WARREN (141) |
| Ac. Am. N-term. (HSx 128 $F_2$) | néant | SANGER (119) |
| Ac. Am. C-term. (HSx 122 $F_1$) | néant | Carboxypeptidase (49) |

# CHAPITRE VI

# PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

## A - DOSAGE BIOLOGIQUE DES ACTIVITES FSH, LH ET TSH DE LA FRACTION "Sx".

### 1/ **Dosage de la FSH par la méthode de STEELMAN et POHLEY** (129)

Il convient de situer à la fin de ce travail la FSH obtenue par rapport aux étalons qui existent.

La méthode de dosage utilisée pour la FSH est celle de STEELMAN et POHLEY, méthode qui nous a permis de suivre la purification de cette hormone. Nous rapportons les résultats à la préparation FSH. NIH. $S_1$ qui est injectée à chaque dosage.

D'après le Tableau XIV nous avons vu que plusieurs filtrations sur Gel Sephadex G 100 nous permettaient d'obtenir une FSH "Sx" d'activité équivalente à celle de la préparation Sx127 F1. Par conséquent, nous pouvons dire que la FSH atteint, au stade "Sx" une activité de 30 unités par mg (avec des limites de 23,6 à 38,5 pour p = 0,05).

C'est sur cette fraction "Sx" que nous avons fait la plupart des études de stabilité. C'est également son action que nous étudions sur la spermatogénèse chez le rat mâle.

### 2/ **Dosage de LH par la méthode de PARLOW** (103)

Les dosages de l'activité LH ont été effectués au début de ce travail par la méthode de l'accroissement du poids de la prostate ventrale après injection de LH. Il ne semble pas, actuellement, d'après PARLOW (105), que ce test soit applicable à la recherche de LH à l'état d'impureté en présence de FSH en quantité importante.

Par conséquent, nous avons appliqué à cette recherche de la LH la méthode plus spécifique de la déplétion de l'acide ascorbique ovarien. Les résultats des dosages effectués sur une fraction "Sx" (H Sx121 F1) sont donnés dans le Tableau XXXIII.

Si nous rapportons ce résultat à l'étalon LH-NIH-$S_1$, nous trouvons 0,003 unités LH-$S_1$ par mg de la préparation "Sx".

Enfin, le produit qui subit la digestion par la trypsine ne possède plus qu'une contamination inférieure à 0,001 unité LH-$S_1$ par mg (Voir le Tableau XL).

3/ **Dosage de la TSH - méthode de McKENZIE** : (91)

Ce dosage effectué sur 1 mg de fraction "Sx" (H Sx122 F2) n'a pas permis de détecter d'activité TSH. La sensibilité du dosage étant de 1 mU de TSH. USP, nous pouvons dire que la contamination est inférieure à 1 mU de TSH par mg de la préparation "Sx".

## B - VARIATION DU RAPPORT FSH/LH

La recherche d'un accroissement de l'activité biologique exprimée en unités FSH -but que nous avons d'abord poursuivi- doit être accompagnée d'une augmentation du rapport des activités FSH/LH.

Ce rapport nous permet en effet de chiffrer la séparation qui se produit entre ces deux activités gonadotropes hypophysaires. Il nous permet aussi, par sa variation même, de prouver que l'on peut enrichir une fraction glycoprotéique en activité FSH seulement, ce qui constitue une réponse au problème de l'unicité ou de la dualité des hormones gonadotropes. A la limite, il pourrait aider à répondre à la question de l'existence ou non d'une activité LH intrinsèque à la molécule de FSH.

Le Tableau XXXIV donne quelques valeurs de ce rapport pour notre fraction "Sx" et pour des préparations de FSH préparées dans d'autres laboratoires.

On constate que la FSH de WOODS et SIMPSON, qui possède une forte activité exprimée en unités FSH, est par contre fortement contaminée en LH. (Le rapport FSH/LH est faible).

Au contraire, les préparations FSH de REICHERT et PARLOW présentent une contamination très faible en LH. Cependant, dans ce cas, l'activité FSH étant seulement au niveau de celle de l'étalon FSH $S_1$, les quantités à injecter, pour une étude de l'effet produit, deviennent importantes.

Notre fraction "Sx", même sans digestion par la trypsine présente, au contraire, une activité FSH élevée et une contamination LH très faible, ce qui lui confère le meilleur rapport dans cette dissociation des deux effets.

Si nous calculons ce rapport pour la FSH après digestion enzymatique, nous obtenons une valeur de 180. C'est cette préparation de FSH qui sera étudiée entre autres quant à son effet sur la sparmatogénèse chez le rat impubère.

## C - ETUDES DE DIFFERENTES PREPARATIONS DE FSH CHEZ LES RATS MALES HYPOPHYSECTOMISES

Les méthodes de dosages biologiques utilisées pour suivre la purification, spécifiques de chacune des activités d'après leurs auteurs, présentent cependant l'inconvénient d'être réalisées sur des animaux ayant leur hypophyse. Il ne peut donc être question de déterminer l'action réelle de la FSH dans de telles conditions.

Tableau XXXIII

Dosage de l'activité LH par la méthode de PARLOW (103) dans une préparation de FSH "Sx" (H Sx121 $F_1$)

Résultats rapportés à l'étalon LH. NIH. $S_1$.

| Fractions | Rapport des activités avec intervalle de confiance pour p = 0,05 | e % | $\lambda$ |
|---|---|---|---|
| FSH "Sx" (H Sx121 $F_1$) | 0,0031 (0,005 à 0,002) | 36,62 | 0,44 |

Tableau XXXIV

Etude du rapport des activités FSH et LH de préparations de FSH de mouton obtenues par différents laboratoires, d'après PARLOW (105)

| Fractions | Unités FSH/mg (étalon FSH. NIH. $S_1$) | Unités LH/mg (étalon LH. NIH. $S_1$) | Rapport $\frac{FSH}{LH}$ | Variation du rapport FSH/LH(*) |
|---|---|---|---|---|
| Etalon FSH. NIH. $S_1$) | 1 | 0,006 | 167 | 1 |
| ELLIS (36) | 11 | 0,0075 | 1466 | 9 |
| IV-19 F WOODS et SIMPSON (**) | 32 | - | | 15 |
| REICHERT et PARLOW FSH-1 | 1,4 | 0,00022 | 6364 | 38 |
| FSH-2 | 0,8 | 0,0001 | 8000 | 48 |
| FSH "Sx" (sans digestion trypsique) (H Sx127 $F_1$) | 30 | 0,003 | 10000 | 60 |

(*) Ces chiffres expriment l'augmentation de ce rapport, la valeur calculée pour la FSH. NIH. $S_1$ étant prise comme unité.

(**) Pour le produit IV-19 F le rapport a été calculé d'après des méthodes de dosages différentes (augmentation de la taille des follicules ou de l'interstitielle ovarienne).

Il nous faut donc à présent rechercher l'action que peut avoir une fraction "Sx" sur des animaux dont on a enlevé l'hypophyse.

C'est d'abord le rat mâle qui nous a intéressé pour rechercher une dissociation des actions FSH et LH.

Enfin, deux types d'animaux seront étudiés : ceux qui seront hypophysectomisés adultes, chez lesquels on cherchera à rétablir une fonction qui a existé, et ceux qui seront hypophysectomisés impubères, chez lesquels on cherchera à créer une fonction par la FSH exogène.

Comme nous l'avons vu dans les études bibliographiques des propriétés biologiques, on admet classiquement que FSH contrôlerait chez le mâle la spermatogénèse, c'est l'activité exocrine du testicule, tandis que LH stimulerait l'interstitielle en vue d'induire et de maintenir la sécrétion d'androgène, c'est l'activité endocrine du testicule.

Ces actions furent cependant remises en question par les études faites ces dernières années, en particulier par WOODS et SIMPSON (150) et par LOSTROH (87).

Ces auteurs ont en effet rapproché de leurs résultats des travaux anciens soutenant que la testostérone stimule la spermatogénèse - faits qui ont été vérifiés récemment par BOCCABELLA (16) entre autres. Il était alors normal, en étudiant l'action de fractions FSH purifiées, de considérer que la contamination LH de la préparation injectée était utilisée par le testicule pour secréter la testostérone nécessaire au dernier stade de la spermatogénèse.

Ces auteurs considèrent alors que, pour obtenir la spermatogénèse totale chez le rat hypophysectomisé, il faut injecter des doses faibles de FSH additionnée de LH ou de testostérone. Ces mêmes doses de FSH injectées seules étant incapables de remplir cette fonction, ils en concluent que LH (ou la testostérone) est bien indispensable à la formation des spermatozoïdes.

Deux remarques sont à faire cependant sur cette action de la testostérone.

1/ Elle doit être injectée aussitôt après l'hypophysectomie, sinon elle n'a pas d'action.

2/ Même injectée aussitôt après l'hypophysectomie, elle n'a qu'une action limitée dans le temps. Elle ne peut maintenir la spermatogénèse à elle seule.

Ces deux remarques sont également applicables à l'action de LH.

Ceci, à la rigueur, peut s'expliquer si l'on considère que la testostérone n'agit qu'aux derniers stades de la spermatogénèse. En effet, si les stades antérieurs font défaut après hypophysectomie, la LH (ou la testostérone) ne devient d'aucune utilité.

Il nous apparaît alors que la spermatogénèse se fait en plusieurs étapes dont chacune exige une stimulation particulière. Cette conclusion résulte aussi d'autres travaux. Suivant CLERMONT et MORGENHALTER (23), l'hypophysectomie ralentit les mitoses au niveau des spermatogonies et freine les méïoses de 1 er et 2 ème ordre.

Ces observations concordent avec les travaux d'ORTAVANT et DESCLIN (30). En effet, ces auteurs démontrent que les gonadotropines n'agissent pas sur la durée de la spermatogénèse qui reste constante, mais sur les dégénérescences qui se produisent à chaque division si les conditions ne sont pas favorables (22) (100).

Cette diminution du "rendement" de chacune des divisions depuis le début du cycle spermatogénétique entraîne l'absence quasi totale des derniers stades. Il en résulte donc, en apparence, une inhibition de la spermiogénèse, avec absence de spermatozoïdes. Les premiers stades, au contraire, se rencontrent, semble-t-il, même dans une hypophysectomie totale. La présence de spermatocytes est possible en dehors de toute stimulation hypophysaire.

HERLANT (59), en discutant ces résultats, conclut que le mécanisme initial de la spermatogénèse échappe au contrôle de l'hypophyse ; celle-ci n'agirait alors que par l'intermédiaire d'un médiateur (il s'agirait du syncitium de Sertoli), qui aurait un rôle nourricier particulièrement important dans les derniers stades.

D'où, pour WOODS et SIMPSON, le rôle important de LH, et celui inconnu de FSH.

Il reste difficile à expliquer, dans ces conditions, que LH n'ait qu'un rôle limité dans le temps puisqu'il semble acquis que les premiers stades sont soustraits à l'action hypophysaire.

C'est en présence de ces différentes contradictions que nous avons commencé l'étude biologique, chez le rat mâle hypophysectomisé, de différentes fractions de FSH.

## I - ETUDE DE PREPARATIONS DE FSH OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR AMBERLITE IRC 50

Afin de montrer la progression de la purification de la FSH par les différents procédés utilisés, nous donnons d'abord quelques résultats acquis avec une préparation moins purifiée que la fraction finale.

Une première étude est réalisée sur une fraction issue d'une chromatographie sur Amberlite IRC 50 (voir page 40).

La méthode de GREEP (54) est appliquée à des rats Wistar hypophysectomisés à 24 jours. 4 jours après cette intervention, ils reçoivent 8 doses de 0,5 ml en injection sous-cutanée, à raison de 2 par jour, d'une solution du produit à étudier. L'autopsie est pratiquée 24 heures après la dernière injection. Les prostates ventrales sont fixées 24 heures au liquide de Bouin avant d'être pesées.

Les résultats sont donnés dans le Tableau XXXV.

Tableau XXXV

Résultats de l'injection de FSH obtenue par chromatographie sur Amberlite à des rats impubères hypophysectomisés
(Voir conditions de dosage page 28)

| | Dose totale µg | Nombre d'animaux | Poids | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | de l'animal (g) | de la prostate (mg) | d'un testicule (mg) |
| Animaux témoins | 0 | 3 | 48 | 11,5 | 41,5 |
| FSH | 100 | 3 | 54 | 15,9 | 126,0 |

Nous avons injecté ici 100 µg de FSH et nous constatons une action sur l'augmentation pondérale des testicules (action FSH) et une action sur les prostates ventrales (action (LH).

Tableau XXXVI

Résultats de l'injection de la FSH aux rats mâles impubères hypophysectomisés. La dose totale est répartie en 16 injections (2 inj. par jour pendant 8 jours).

| Préparation | Dose totale (µg) | Nombre d'animaux | Poids et Moyennes | | | Examen histologique |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | des testicules (mg) | de la prostate ventrale (mg) | des vésicule séminale (mg) | |
| Animaux témoins | 0 | 5 | 187<br>177<br>138 } 168<br>190<br>150 | 12,1<br>9,0<br>9,0 } 8,8<br>6,8<br>7,2 | -<br>-<br>- } 9,3 (•)<br>9,8<br>8,8 | - |
| HXE-13 | 1 | 3 | 123<br>173 } 146<br>143 | 6,7<br>9,7 } 9,1<br>11,0 | 7,4<br>8,6 } 8,6<br>9,7 | (a) |
| | 15 | 3 | 308<br>250 } 273<br>261 | 11,7<br>10,5 } 10,4<br>9,1 | -<br>- }<br>- } | -<br>- |
| | 45 | 3 | 343<br>328 } 332<br>325 | 9,4<br>7,6 } 8,4<br>8,1 | -<br>- }<br>- } | -<br>- |
| | 200 | 3 | 448<br>470 } 470<br>491 | 16,3<br>20,2 } 18,0<br>17,5 | 11,8<br>12,9 } 13,0<br>14,4 | (b) |
| NIH. FSH. $S_1$ | 5 | 3 | 198<br>182 } 175<br>146 | 18,6<br>10,1 } 14,0<br>13,4 | 9,3<br>8,8 } 8,4<br>7,0 | (c) |
| | 90 | 3 | 263<br>262 } 268<br>279 | 12,7<br>14,3 } 13,6<br>13,9 | -<br>-<br>- | - |
| | 200 | 2 | 413<br>} 364<br>315 | 13,9<br>} 13,2<br>12,5 | 9,2<br>}<br>8,4 | (d) |

(•) Cette détermination n'a été faite que sur deux animaux.
(a) Action faible mais bien distincte sur la spermatogénèse
(b) Action très nette sur la lignée. Pas de spermatozoïdes
(c) Faible action sur la spermatogénèse
(d) Action très nette sur la lignée. Pas de spermatozoïdes

Une autre étude a été faite sur une fraction plus purifiée (HXE-13) toujours issue d'une chromatographie sur Amberlite IRC 50.

Le dosage de STEELMAN et POHLEY nous indique un titre de 7 unités FSH environ par mg. Les conditions d'étude chez le rat mâle Wistar hypophysectomisé sont voisines des précédentes, les injections étant faites ici pendant 8 jours au lieu de 4.

Le Tableau XXXVI rapporte les résultats pour cette préparation HXE-13 et pour l'étalon FSH. NIH. $S_1$.

Nous constatons ainsi que 15 µg de notre préparation agissent déjà très fortement sur le poids des testicules. D'autre part, il n'y a une action sur

le poids des prostates ventrales et des vésicules séminales qu'avec 200 µg de cette même préparation.

Quant à l'étalon, il donne, avec 5 µg, une augmentation du poids des prostates ventrales. Cette action n'est d'ailleurs pas croissante en fonction de la dose injectée. Au contraire, le poids des vésicules séminales n'a pas varié quelle que soit la dose de l'étalon injectée. Enfin, le temps d'injection (8 jours) est trop court pour nous permettre de tirer des conclusions certaines sur l'évolution spermatogénétique.

## II - ETUDE DES FRACTIONS "De" ET "Sx".(*)

### 1/ Rats adultes hypophysectomisés depuis 4 mois :

Nous avons cherché dans cette expérience à mettre en évidence le rôle exact de la FSH, chez des animaux ce souche Wistar qui ont été hypophysectomisés adultes. Ces animaux qui ont eu des testicules fonctionnels ne sont utilisés qu'après plus de 4 mois d'hypophysectomie. L'involution des testicules est alors complète (tubes et interstitielle) et, par prélèvement d'un testicule au début des injections, on peut vérifier l'absence totale de reliquat hypophysaire en constatant qu'il n'existe pas de spermatides. Chez les mêmes animaux, les organes annexes sont involués : les cellules interstitielles, non stimulées par LH ne sécrètent plus d'androgènes. Enfin, thyroïdes et surrénales sont au repos.

*Conditions expérimentales et résultats (Tableaux XXXVII et XXXVIII)*

Nous avons utilisé des rats mâles Wistar adultes. Ils ont été hypophysectomisés à l'âge de 5 mois. 4 mois plus tard on prélève le testicule gauche qui servira de témoin au début des injections. Les fractions étudiées sont issues de deux stades différents de la purification : H De51 F3 venant de la chromatographie sur DEAE-cellulose, et H Sx128 F2 venant de filtrations sur Sephadex G 100. Les quantités injectées (Voir Tableau XXXIX) sont en rapport avec l'activité FSH déterminée par le dosage de STEELMAN et POHLEY. Les injections sous-cutanées sont faites 2 fois par jour pendant 30 jours.

On constate par histologie (figures identiques à celles obtenues (31) (32) pour les rats impubères) que la spermatogénèse a repris totalement alors que les glandes annexes sont restées involuées, les cellules interstitielles n'ayant pas repris leur fonction secrétrice. Thyroïdes et surrénales sont également au repos. Il semble donc qu'on ait dans ces expériences une action uniquement FSH.

Or, pour les deux fractions, la quantité de LH reçue par animal est sensiblement la même car, si la fraction "De" possède une contamination LH plus faible par mg (Voir Tableaux XXXIX et XL) que la fraction "Sx", elle doit être injectée à une dose 5 fois plus forte pour avoir la même action FSH.

L'état de pureté atteint par la fraction "Sx" nous permet alors de conclure que l'on peut restaurer la spermatogénèse chez ces rats en injectant 10 µg par jour de FSH "Sx" pendant 30 jours (soit 300 µg au total). La contamination LH

---

(*) Ce travail a été réalisé par Monsieur le Professeur COURRIER et Madame COLONGE.

Tableau XXXVII

Action de la FSH "De" sur des rats WISTAR hypophysectomisés adultes

Les animaux reçoivent la fraction "De" (H De51 $F_3$) 50 µg par jour en 2 injections de 0,5 ml pendant 30 jours -Hypophysectomisés à 5 mois- Un testicule est prélevé 4 mois et 10 jours après l'hypophysectomie et les injections sont commencées 10 jours après ce prélèvement.

Autopsie 24 heures après la dernière injection

| N° | Poids du corps à | | Poids du 1° testicule A prélevé | Poids du 2° testicule B prélevé | Poids des | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | l'hypophysectomie | l'autopsie | | | Surrénales | Thyroïdes | Vésicules séminales |
| 5150 | 325 g | 310 g | 453 mg | 1185 mg | 9 mg | 12 mg | 79 mg |
| 5151 | 320 g | 215 g | 163 mg | 406 mg | 9 mg | 8 mg | 105 mg |
| 5152 | 300 g | 255 g | 213 mg | 814 mg | 10 mg | 10 mg | 79 mg |
| 5154 | 280 g | 205 g | 180 mg | 612 mg | 8,5 mg | 9 mg | 100 mg |
| Témoins (animal entier) | | | Poids d'un testicule 1500 mg à 1700 mg | | 28 mg à 35 mg | 15 à 20 mg | 800 mg |

*Remarques histologiques :*

Sauf peut-être pour le 5150 (A) qui n'était pas au repos aussi complet, aucun des testicules prélevés à ce moment ne possède d'activité spermatogénétique. Il n'y a aucune activité non plus de la glande interstitielle.

Par contre, tous les testicules (B), après injections de FSH, ont repris une pleine activité spermatogénétique sans action sur la réparation des glandes interstitielles, comme le montre par ailleurs l'involution totale des vésicules séminales. De même, il n'y avait aucune action sur les prostates ventrales.

Tableau XXXVIII

Action de la FSH "Sx" sur des rats WISTAR hypophysectomisés adultes

Les animaux reçoivent la fraction "Sx" (H Sx128 $F_2$) 10 µg par jour, en 2 injections de 0,5 ml pendant 30 jours. Hypophysectomisés à 5 mois- Un testicule est prélevé 4 mois et 10 jours plus tard et les injections sont commencées 10 jours après ce prélèvement.

Autopsie 24 heures après la dernière injection.

| N° | Poids du corps à | | Poids du 1° testicule A prélevé | Poids du 2° testicule B prélevé | Poids des | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | l'hypophysectomie | l'autopsie | | | Surrénales | Thyroïdes | Vésicules séminales |
| 5149 | 277 g | 255 g | 207 mg | 424 mg | 13 mg | 11 mg | 85 mg |
| 5153 | 256 g | 180 g | 152 mg | 430 mg | 9,5 mg | 10 mg | 76 mg |

*Remarques histologiques :*

Dans les deux cas, les testicules A n'ont pas de spermatides, ni de spermatozoïdes.

Par contre, nous notons après injections de la protéine, la reprise totale de la spermatogénèse avec libération des spermatozoïdes retrouvés dans l'épididyme.

Cette reprise de la spermatogénèse s'est effectuée en absence d'action sur les cellules interstitielles et, par suite, sur les vésicules séminales et les prostates ventrales.

Tableau XXXIX

Activité spécifique FSH des fractions "De" et "Sx"
Méthode de STEELMAN et POHLEY (129)

Etalon utilisé FSH. NIH. $S_1$, $\lambda$ : indice de précision

| Fraction | Rapport des activités | Intervalle de confiance pour p = 0,05 | $\lambda$ |
|---|---|---|---|
| H De51 | 6,30 | 3,56 – 11,12 | 0,21 |
| H Sx128 | 24,30 | 17,04 – 34,65 | 0,16 |
| H Sx127 (*) | 30,13 | 23,59 – 38,48 | 0,11 |

(*) L'activité de ce produit est donnée avant le traitement à la trypsine.

Tableau XL

Activité spécifique LH des fractions "De" et "Sx"
Méthode de PARLOW (103)
Etalon utilisé LH. NIH. $S_3$, $\lambda$ : indice de précision

| Fraction | Rapport des activités | Intervalle de confiance pour p = 0,05 | $\lambda$ |
|---|---|---|---|
| H De52 | 0,007 | 0,0002 – 0,0022 | - |
| H Sx121 $F_1$ | 0,0039 | 0,0024 – 0,0061 | 0,44 |
| H Sx121 $F_1$ (après digestion trypsique) | 0,001 | 0,0001 – 0,006 | - |

résiduelle peut être chiffrée à 1 µg de LH. NIH. $S_1$ pour la durée totale du traitement, soit 1/30 de µg de LH au plus par jour.

Si l'on sonsidère que l'étalon LH. NIH. $S_1$ n'est pas pur et que des purifications récentes ont permis d'améliorer de 5 fois l'activité d'une fraction LH, c'est donc moins de 1/150 µg de LH de mouton pure qui ont été injectés par jour.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par LOSTROH en 1963 par injection de FSH. NIH. $S_1$. Les rats de souche Long-Evans sont hypophy-

sectomisés à 42 jours. Les injections de FSH ne sont faites que 6 mois après l'hypophysectomie. L'auteur conclut qu'il est nécessaire d'injecter 100 µg par jour de cette préparation de FSH pour rétablir les premiers stades de la spermatogénèse.

Cette quantité de FSH étant contaminée par environ 1 µg de LH, l'auteur pense alors que la spermatogénèse totale ne peut être acquise qu'en présence de cette quantité de LH qui, stimulant l'interstitielle, crée un milieu favorable pour les derniers stades de formation du spermatozoïde.

On remarquera cependant en analysant ce travail que la durée maximum de 21 jours pour les injections semble insuffisante, ce qui expliquerait que, même par injection de 100 µg de FSH. NIH. $S_1$, et 100 µg de LH par jour, il n'y a eu que des spermadides (phase Golgi).

2/ **Rats impuberes hypophysectomisés depuis 15 jours**

Ces rats mâles sont de souche Holtzman. Ils sont hypophysectomisés entre 24 et 26 jours. On prélève un testicule, qui servira de témoin, 15 jours après cette intervention. On vérifie ainsi si l'hypophysectomie est totale. Tous les animaux retenus présentent alors des canaux séminifères étroits, des spermatocytes et quelques rares cellules multinuclées de dégénérescence (Voir fig. 31).

Les animaux retenus sont alors divisés en 3 lots.

- Le lot A reçoit la solution physiologique additionnée de 0,5 % de sérumalbumine, solution qui servira pour toutes les injections (excipient).
- Le lot B reçoit 2 µg par jour de FSH (H Sx127 F1) ayant subi une digestion trypsique, en 2 injections sous-cutanées de 0,5 ml. L'activité LH de ce produit est donc voisine de 0,001 unité LH par mg (Voir le Tableau XL).
- Le lot C reçoit 4 µg de cette FSH dans les mêmes conditions que ci-dessus.

Les Tableaux XLI et XLII donnent les résultats individuels pour ces différents traitements qui durent 20, 29 ou 39 jours suivant les animaux.

Les selles turciques de tous ces rats ont été examinées en coupes sériées, et seuls ceux ne présentant aucun reliquat hypophysaire ont été retenus.

On peut voir d'après les figures 31-32-33 les résultats acquis sur la spermatogénèse et sur les vésicules séminales.

On constate alors, d'après les moyennes du Tableau XLIII que la prostate ventrale n'accuse pratiquement aucune variation de poids par rapport aux animaux témoins, que l'on injecte 2 ou 4 µg par jour de cette préparation de FSH. Un animal du lot A de même âge, mais hypophysectomisé partiellement a une prostate qui pèse 211 mg.

Pour les moyennes concernant les poids des vésicules séminales, on voit qu'avec 4 µg de FSH, il pourrait y avoir une légère action pondérale chez 2 animaux sur 7. L'animal du lot A, à hypophysectomie partielle a des vésicules séminales pesant 490 mg.

Il paraît cependant difficile de penser que cette action sur les 2 vésicules séminales soit due à la contamination LH de notre FSH. Nous avons injecté au maximum 0,16 µg de LH. NIH. $S_1$ en 40 jours, soit 0,004 µg par jour, dose qui semble vraiment faible pour induire une sécrétion de testostérone si l'on considère que pour WOODS et SIMPSON (150) il ne commence

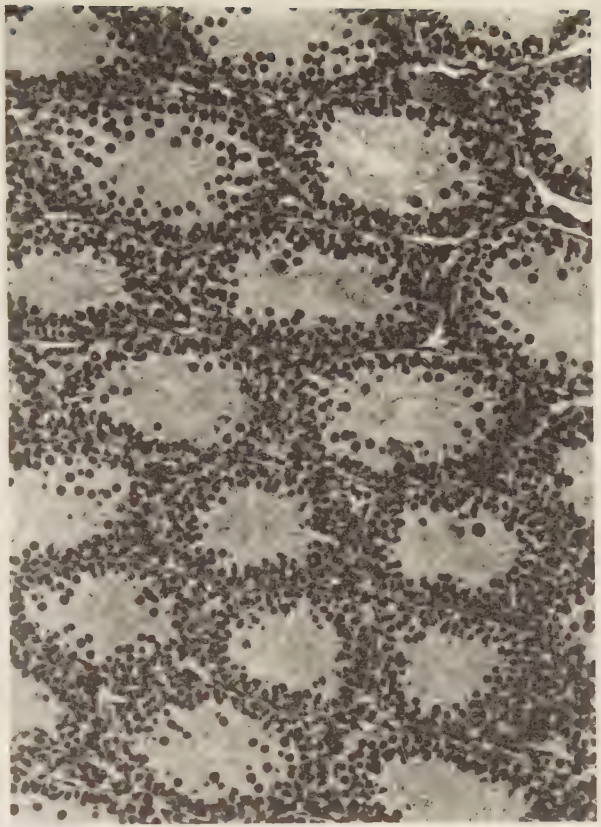


Fig. 31 - Testicule rat, lot C, n° 5 (Gx290) avant le traitement

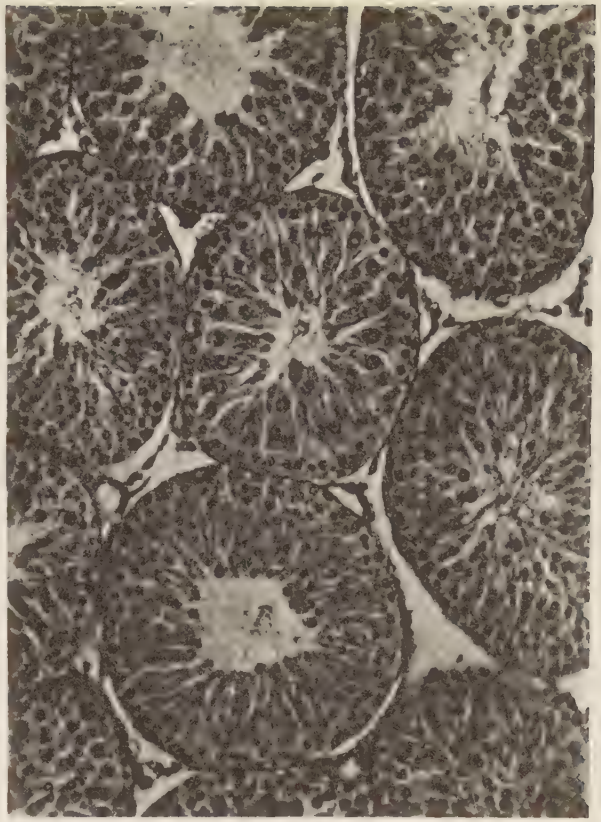


Fig. 32 - Testicule rat, lot C, n° 5 (Gx290) après le traitement

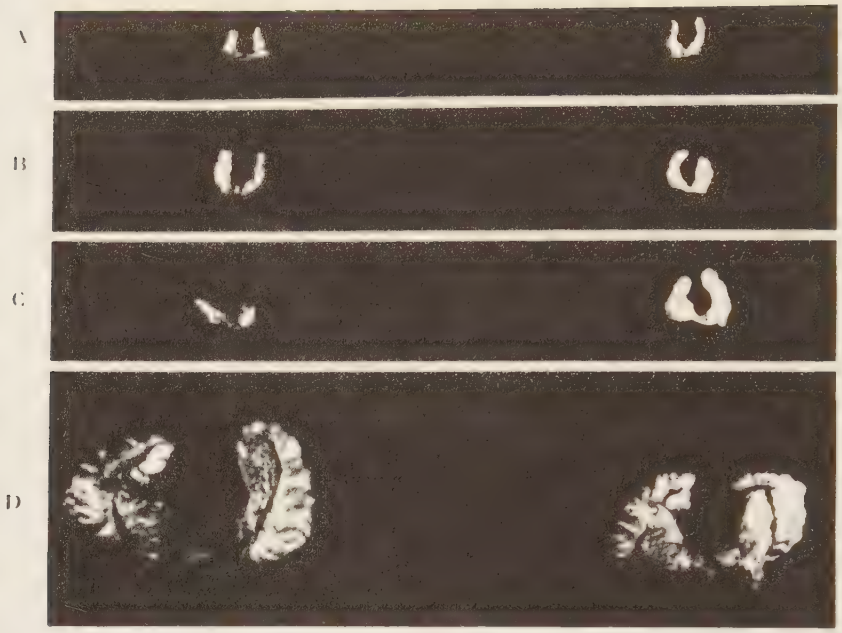


Fig. 33 - Vésicules seminales :
A : gauche, rat A 9 ; droit, rat A 3 C : gauche, rat C 8 ; droit, rat C 6
B : gauche, rat B 5 ; droit, rat B 11 D : Rats témoins normaux.

Tableau XLI

Poids de quelques organes de rats SPRAGUE -DAWLEY mâles non hypophysectomisés- Autopsie à 70 jours

Testicule a enlevé à 40 jours
" b " à 70 jours

| Poids du corps (g) | Poids en mg | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | des testicules | | des vésicules séminales | des prostates ventrales | des sur-rénales | de la thyroide |
| | a | b | | | | |
| 298 | 1618 | 1600 | 813 | 287 | 39 | 16 |
| 295 | 1547 | 1554 | 863 | 380 | 36, 5 | 13 |
| 302 | 1645 | 1693 | 980 | 411 | 38, 0 | 11, 5 |
| 345 | 1662 | 1621 | 610 | 435 | 34, 0 | 10 |
| 260 | 1553 | 1514 | 869 | 401 | 28, 5 | 9, 5 |

Moyenne en mg avec erreur type

| | |
|---|---|
| Poids du corps | 300 ± 13,50 |
| " des testicules a | 1605 ± 23,54 |
| " " " b | 1596 ± 30,45 |
| " des vésicules séminales | 827 ± 60,72 |
| " des prostates ventrales | 382,80 ± 25,53 |
| " des surrénales | 35,20 ± 1,88 |
| " de la Thyroïde | 12,00 ± 1,17 |

à y avoir une réaction pondérale des vésicules séminales qu'avec 1 à 1,3 µg par jour de LH.

Chez tous ces animaux, la spermatogénèse est malgré tout totale, qu'il y ait ou non accroissement du poids des vésicules séminales. On peut également obtenir des spermatozoïdes, même avec 2 µg par jour de notre préparation.

En ce qui concerne la spermatogénèse, WOODS et SIMPSON ont injecté 8,5 µg par jour, pendant 28 jours, de leur préparation de FSH (IV-19 F), d'activité FSH 32 fois plus grande que celle de l'étalon FSH. NIH. $S_1$ et plus contaminée en LH que notre préparation, sans obtenir de spermatozoïdes. Les rats étaient de souche Long-Evans, hypophysectomisés à 40 jours, et les injections étaient commencées 15 jours après l'opération. Ils n'ont obtenu des spermatozoïdes qu'en additionnant à leur FSH 250 µg par jour de propionate de testostérone. Ils en concluent que FSH seule ne peut maintenir cette fonction.

Tableau XLIII

Action de la FSH chez le rat impubère hypophysectomisé depuis 15 jours (Holtzman)

Traitement : Injection 2 × jour, FSH à 30 U. FSH. NIH. $S_1$
Durée : 29 à 39 jours

| Traitement | Nombre | Testicule mg | Prostate mg | Vésicule mg |
|---|---|---|---|---|
| NaCl | 6 | 77,6 ± 7,6 | 5,6 ± 0,8 | 8,2 ± 0,8 |
| 2 µg FSH | 6 | 375,7 ± 105,0 | 7,4 ± 1,2 | 10,1 ± 1,6 |
| 4 µg FSH | 7 | 594,7 ± 60,8 | 7,4 ± 0,8 | 15,5 ± 3,5 |

NaCl : tubes rétract. quelques spermatocytes, cell. mul.

2 µg FSH : spermatides ou spermatozoïdes

4 µg FSH : spermatozoïdes dans tous les cas.

Il nous semble au contraire, d'après nos essais, qu'il est possible de provoquer ou de restaurer totalement la spermatogénèse avec le seul principe FSH. En effet nous avons pu obtenir des spermatozoïdes soit chez des animaux hypophysectomisés impubères, soit chez des animaux adultes hypophysectomisés depuis 4 mois, avec des doses de FSH qui ne devraient produire aucun effet sur l'interstitielle.

Tableau XLII

(Animaux utilisés : Rats Holtzman hypophysectomisés depuis 15 jours).

| N° Rat | Testicule gauche (avant traitement) mg | Début traitement | Autopsie Date Poids du corps g | Testicule droit poids (mg) et structure | Poids des glandes | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Prostate ventrale mg | les 2 vésicules séminales mg | Thyroïdes mg | les 2 Surrénales mg |
| Lot A | | | | (Excipient) | | | | |
| 1 | 67,5 | 9-5-64 | 28-5-64<br>65 | 42<br>Tubes rétractés, quelques spermatocytes et cellules multinucléées. | 4,0 | 5,0 | 3,0 | 3,5 |
| 2 | 70,0 | id | 6-6-64<br>67 | 59<br>id | 5,0 | 8,0 | 4,0 | 7,0 |
| 3 | 60,0 | id | 16-6-64<br>75 | 54<br>id | 7,0 | 8,0 | 4,0 | 8,0 |
| 4 | 70,0 | id | 6-6-64<br>73 | 60<br>id | 9,0 | 9,5 | 3,0 | 7,0 |
| 9 | 110,0 | 19-5-64 | 19-6-64<br>102 | 77<br>id | 3,8 | 10,5 | 4,5 | 9,0 |
| 11 | 88,0 | id | 19-6-64<br>75 | 85<br>id | 4,8 | 8,0 | 3,0 | 8,0 |
| Lot B | | | | (2 µg FSH Sx127 par jour) | | | | |
| 1 | 58,0 | 9-5-64 | 28-5-64<br>63 | 150<br>Spermatogénèse active spermatides | 4,5 | 6,0 | 3,0 | 4,8 |
| 2 | 59,0 | id | 6-6-64<br>71 | 198<br>spermatides | 8,0 | 7,5 | 3,0 | 7,5 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 61,0 | id | 16-6-64<br>70 | 733<br>Spermatozoïdes mûrs | 11,5 | 17,0 | 3,0 | 6,0 |
| 8 | 106,0 | 19-5-64 | 18-6-64<br>76 | 276<br>Quelques têtes spermato-zoïdes | 4,3 | 11,0 | 3,0 | 8,0 |
| 9 | 70,0 | id | 18-6-64<br>75 | 227<br>Début spermiogénèse | 6,0 | 8,0 | 5,0 | 9,0 |
| 11 | 111,0 | id | 18-6-64<br>87 | 670<br>Nombreux spermatozoïdes mûrs | 10,0 | 11,0 | 3,0 | 7,0 |
| Lot C (4 µg FSH Sx127 par jour) | | | | | | | | |
| 1 | 72,0 | 9-5-64 | 28-5-64<br>66 | 325<br>Quelques têtes spermato-zoïdes | 5,0 | 6,0 | 3,0 | 5,0 |
| 2 | 76,0 | id | 6-6-64<br>76 | 773<br>Nombreux spermatozoïdes | | 23,0 | 3,0 | 9,0 |
| 3 | 67,0 | id | 6-6-64<br>72 | 542<br>Spermatozoïdes mûrs | 6,5 | 11,5 | 5,0 | 8,0 |
| 5 | 62,0 | id | 6-6-64 | 520<br>Spermatozoïdes | 8,0 | 11,0 | 4,0 | 8,0 |
| 6 | 55,0 | id | 16-6-64<br>70 | 134<br>Nombreux spermatozoïdes | 10,0 | 29,5 | 4,0 | 7,0 |
| 8 | 87,0 | 19-5-64 | 18-6-64<br>95 | 688<br>Nombreux spermatozoïdes | 9,0 | 10,0 | 5,0 | 11,0 |
| 11 | 89,0 | id | 18-6-64<br>88 | 498<br>Spermatozoïdes | 6,0 | 12,5 | 6,0 | 9,0 |

Nous rejoignons par cette conclusion les travaux anciens sur les gonadotropines, ainsi que les études histologiques d'HERLANT (59) chez la chauve-souris ou chez la taupe. A la période de spermatogénèse active cet auteur note une prédominance des cellules β, cellules à FSH dans l'hypophyse, forme qui persiste également pendant l'oestrus hivernal chez la femelle, tandis que l'autre forme des cellules hypophysaires LH prédomine pendant l'hypertrophie de l'interstitielle et des caractères sexuels secondaires.

# DISCUSSION

Arrivé au terme de ce travail nous voudrions dégager quelques observations nouvelles sur l'étude des gonadotropines, et de la FSH en particulier.

Voici plus de trente ans que les gonadotropines sont découvertes, et que leur isolement est commencé. De nombreux travaux ont été consacrés à ces sujets. Il est donc possible d'établir quelques comparaisons avec ce que nous avons obtenu.

**Méthodes de Préparation**

Nous allons discuter successivement les différents points de notre méthode d'extraction et de purification qui nous semblent particulièrement importants et nouveaux.

- Période de prélèvement des hypophyses : la période la plus favorable pour avoir un bon rendement en FSH s'étend de novembre à mars. A part ELLIS (36) qui signale des variations de rendement suivant les hypophyses traitées, aucun auteur ne semble s'être préoccupé de cette question. Elle est cependant très importante puisque, d'après nos expériences, des hypophyses prélevées en juillet nous ont conduit à des rendements très bas en FSH. (jusqu'à 10 % de ceux acquis avec des glandes prélevées en janvier).

Ainsi il y aurait une quantité de FSH plus forte dans l'hypophyse en hiver, période de faible éclairement. Ceci est à rapprocher de cette observation de ORTAVANT et THIBAULT (101) sur le bélier, où une période de jours longs entraîne une baisse de la spermatogénèse par déficience hypophysaire.

- *Délipidation :*

Nous avons choisi de deshydrater et de délipider les glandes fraîches par des traitements successifs à l'acétone et au butanol. Ces deux traitements nous ont permis d'augmenter le rendement global en FSH dans de fortes proportions.

- *Extraction :*

Le volume de la solution d'extraction doit être suffisant pour permettre un passage total des gonadotropines dans le surnageant. Nous avons vérifié qu'un volume de 3 000 ml de solution de sulfate d'ammonium par kg de glandes fraîches est un minimum.

ELLIS (36) utilise également à l'extraction des volumes de plusieurs litres de solution saline.

**Précipitation par le sulfate d'ammonium**

Ce stade important de la purification a été étudié très en détail. La concentration en ce sel de 2,0 M à pH 7 s'est révélée favorable à une bonne séparation de FSH et de LH, cette dernière hormone étant insoluble dans ces conditions alors que FSH reste en solution.

Un deuxième et un troisième fractionnement sont ajoutés ; ils sont indispensables à la bonne marche des stades qui suivent et notamment à la précipitation alcoolique.

Au cours de ces précipitations, nous avons montré aussi que le temps d'évolution des précipités avait une grande importance, fait qui avait été déjà signalé par JENSEN et coll. (64).

**Chromatographies et filtrations sur Sephadex**

La chromatographie sur DEAE-cellulose et la filtration sur Sephadex sont deux stades essentiels de notre méthode de préparation de FSH. Les rendements, respectivement de 80 % et de 100 % sont excellents dans les deux cas.

La purification, nous l'avons vu, est de 10 fois au cours de la chromatographie sur DEAE-cellulose ; elle est de 2 à 4 fois sur Sephadex.

Nous avons écarté toutes les méthodes qui semblaient dénaturer la molécule de FSH telles que la chromatographie sur Amberlite IRC 50 et sur carboxyméthylcellulose, ou l'électrophorèse de zone. Dans ces méthodes, le rendement en activité, après chaque opération, était voisin de 30 %. Il semble qu'il y ait ici atteinte des structures secondaires ou tertiaires de la molécule, strucutres auxquelles l'activité est probablement liée.

Les pertes d'activité au cours de l'électrophorèse de la FSH ont été rencontrées probablement aussi par d'autres auteurs comme RAACKE et coll. (113), SAXENA et coll. (120) et ELLIS (36). Mais les méthodes de dosages qu'ils utilisaient ne permettaient pas de faire un bilan d'activité suffisamment précis.

**Rendement des différentes préparations**

Il est difficile d'établir des comparaisons entre les rendements que nous observons et ceux obtenus par d'autres auteurs car, dans beaucoup de cas, les données rapportées dans leurs travaux ne sont pas suffisamment précises.

Dans le travail de ELLIS (36), le rendement en FSH est comparable celui que nous atteignons, mais le produit le plus actif qu'il obtient après l'électrophorèse ne titre que 6 à 7 unités FSH par mg, soit environ 480 unités par kg de glandes fraîches.

Pour WOODS et SIMPSON (149), le rendement est de 14 mg de FSH (IV-19 F) titrant 32 unités FSH par mg, soit 450 unités par kg de glandes fraîches, et la purification globale est de 1600 fois. Ce rendement est en moyenne le même que celui que nous obtenons. Leur FSH se différencie cependant de la nôtre comme nous l'avons constaté, du point de vue de sa contamination plus forte en LH, point particulièrement important pour les études biologiques.

**Stabilité**

Aucun auteur, à notre connaissance, n'a signalé l'instabilité très prononcée de la FSH aux stades avancés de pureté.

Nous montrons au contraire que pour des préparations dont l'activité est supérieure à 6 ou 7 unités par mg la FSH est instable en solution aqueuse. Il semble, nous l'avons dit, que tout facteur qui porte atteinte aux structures secondaires et tertiaires de la molécule détruise l'activité biologique.

ELLIS (38) a étudié par contre la stabilité de la FSH suivant le pH et dans l'urée 6 M. Il montre aussi qu'en milieu acide jusqu'à pH 4 la FSH purifiée est détruite, alors qu'à pH 6,8 elle est stable.

Dans l'urée 6 M, même à 40°C pendant les temps de 10 à 24 heures, elle est également stable alors que LH est détruite. C'est là un procédé préconisé par l'auteur pour détruire les dernières traces de LH dans la FSH.

**Propriétes physico-chimiques - Pureté**

Le poids moléculaire avait été déterminé par LI et PEDERSON (84) en 1952. Il atteignait alors 67 000. Nous trouvons pour notre préparation, une valeur beaucoup plus faible entre 30 000 et 31 000. Cette valeur est identique à celle donnée par STEELMANN (136) en 1959 pour la FSH de porc.

De même LI et PEDERSON donnaient une valeur de 4,70 S pour la constante de sédimentation. Nous trouvons aujourdh'ui une valeur de 3,0 S.

Cette dernière valeur se rapproche d'ailleurs de celle que viennent de publier PAPKOFF et coll. (102) en 1964 et qui est de 2,5 S. Ces auteurs ne donnent pas la valeur du poids moléculaire qui correspond à cette fraction.

Pour le pH isoélectrique, par contre, notre valeur de 4,4 à 4,5 est identique à celle de LI et PEDERSON en 1952.

Les études concernant la composition chimique sont peu nombreuses.

D'après nos résultats, la partie peptidique n'est que de 56 % pour notre FSH, les glucides représentant 27 % environ de la molécule.

Les 17 % qui manquent pour compléter ce bilan peuvent s'expliquer par le fait que les chiffres donnés ici ne sont que des estimations minimales : (hydrolyse incomplète, destruction de certains composés, etc...). La présence de corps autres que ceux rapportés est par contre peu probable, en dehors de traces d'eau ou de sels minéraux.

Pour GROSCHEL et LI, en 1960, (55) au contraire, le pourcentage de glucides est beaucoup plus faible, mais leur FSH est peu purifiée.

Pour CAHILL et coll. (19), cette hormone ne contient que 5 % environ de glucides. Ces auteurs mentionnent d'autre part dans la FSH qu'ils étudient la présence de galactosamine, composé totalement absent de notre préparation.

PAPKOFF et coll. (102) en 1964, rendant compte d'une étude préliminaire d'une nouvelle fraction de FSH de mouton, ne trouvent que 11 % de glucides.

Le contenu en acide sialique a été donné par ELLIS (38) pour la FSH. NIH. $S_1$. Il serait de 4,5 %. Pour sa FSH, 29 fois plus active que cet étalon, l'auteur trouve 4,2 %. Il a été montré aussi (52) que l'acide sialique était indispensable pour l'activité biologique.

Enfin, la proportion de tyrosine et de tryptophane étant faible, on trouve un coefficient d'extinction relativement peu élevé (0,6 environ) dans l'ultraviolet.

L'étude de l'homogénéité de notre FSH a pu être faite sur Gel Sephadex et par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Dans ces deux essais, nous avons montré que la fraction "Sx" après 4 filtrations sur Sephadex était hautement purifiée puisque les pics d'activité biologique et de densité optique étaient superposés.

D'autre part, l'absence de groupements terminaux pourrait également indiquer que le produit présente un haut degré d'homogénéité bien que ce ne soit pas là un critère de pureté absolue, des blocages des extrémités de la molécule étant toujours possibles.

**Propriétés biologiques**

Comme nous l'avons constaté dans nos études biologiques, la préparation de FSH que nous obtenons présente à la fois :

- la meilleure activité FSH et

- la plus faible contamination LH parmi toutes les FSH obtenues jusqu'à ce jour.

Il en résulte qu'une étude de l'action de la FSH peut être faite avec des doses très faibles (2 µg par jour), ce qui entraîne une contamination en LH réduite à l'état de trace (0,002 µg au maximum par jour).

Les résultats biologiques acquis :

- la restauration totale de la spermatogénèse chez le rat adulte hypophysectomisé depuis 4 mois,

- l'établissement de la spermatogénèse chez le rat hypophysectomisé impubère

semblent donc être le fait de l'action de la FSH seule.

Ces conclusions, comme nous l'avons vu au Chapitre de l'étude biologique, sont très différentes de celles obtenues ces dernières années par WOODS et SIMPSON avec leur préparation de FSH à 32 unités par mg, et par LOSTROH avec la FSH. NIH. $S_1$.

D'autre part, nous n'avons pas trouvé d'activité TSH.

Quant aux variations constatées dans la valeur du rapport FSH/LH au fur et à mesure de la purification, il semble qu'elles peuvent être un élément de réponse à la question de l'unicité ou de la dualité des gonadotropines antéhypophysaires. S'il n'existait qu'une gonadostimuline, il paraît en effet peu probable qu'on puisse, suivant les étapes d'une préparation, enrichir les fractions en principe FSH seul, comme c'est le cas ici.

Enfin l'action de la trypsine elle-même contribue également à éclairer ces questions puisque, même en fin de purification, on peut encore diminuer de plus de 75 % l'activité LH résiduelle, sans toucher à l'activité FSH.

# RÉSUMÉ CONCLUSION

Nous avons étudié dans ce travail l'hormone hypophysaire folliculo-stimulante ou FSH de mouton.

La première partie résume les données les plus importantes que nous apportent les travaux de ces trente dernières années.

Après un bref historique sur la découverte des gonadotropines, nous recherchons quelles sont les propriétés biologiques de ces stimulines anté-hypophysaires. De ces propriétés découlent les méthodes de dosages que nous passons en revue.

Puis nous donnons un aperçu des principales méthodes d'obtention de la FSH qui existent à ce jour.

Enfin, quelques données bibliographiques sont regroupées au sujet des propriétés physico-chimiques des préparations anciennes.

La seconde partie est consacrée entièrement à l'exposé de notre travail expérimental.

C'est d'abord l'étude des méthodes de dosages utilisées au laboratoire, méthodes qui nous permettent de suivre les progrès de la purification, par l'accroissement de l'activité spécifique FSH, et l'élimination des activités LH et TSH qui lui sont souvent associées.

Ensuite nous étudions les différents stades de préparation de la FSH :

- le traitement des glandes fraîches par les solvants organiques, acétone et butanol ;

- les conditions d'extraction des poudres ainsi obtenues ;

- les fractionnements de cet extrait brut, par précipitation au sulfate d'ammonium, ou à l'éthanol ;

- les chromatographies sur échangeur d'anions (DEAE-cellulose) ou sur échangeur de cations (Amberlite IRC 50 et CM-cellulose) ;

- l'électrophorèse en colonne de Pevikon ou de Sephadex, ou en rigole d'amidon ;

- la filtration moléculaire sur Gel Sephadex.

La fraction qui se révèle la plus purifiée et dont l'activité atteint 30 unités FSH par mg est alors étudiée quant à ses propriétés physico-chimiques et biologiques. La contamination en LH varie de 0,1 % à 0,3 %.

Les données obtenues par ultracentrifugation nous permettent de calculer la constante de sédimentation et le poids moléculaire qui sont respectivement 3,0 S et 30 000 à 31 000.

Le pH isoélectrique (4,4 à 4,5) est déterminé par condensation isoélectrique dans un gradient de saccharose en présence d'un mélange d'ampholytes. La composition qualitative et quantitative pour les amino-acides est rapportée. La partie glucidique (25 à 30 %) est également étudiée ainsi que les extrémités C et N-terminales.

Certaines de ces études nous permettent de conclure que la FSH ainsi préparée atteint un degré d'homogénéité élevé.

Plusieurs essais sont aussi effectués pour déterminer la stabilité de l'hormone vis-à-vis de différents agents physiques ou chimiques ; dissolution dans l'eau, pH, température, congélation, urée, enzymes, etc...

Enfin, une dernière partie est consacrée aux études biologiques. Nous avons recherché l'action de notre préparation hautement purifiée chez le rat mâle hypophysectomisé adulte ou impubère. Dans tous ces essais, nous avons pu rétablir la spermatogénèse chez ces animaux avec des doses quotidiennes de l'ordre de 2 µg à 10 µg.

Ainsi nous avons donc pu obtenir une FSH présentant un haut degré d'homogénéité et nous avons donné certaines de ses propriétés physico-chimiques et biologiques.

# BIBLIOGRAPHIE


(1) ADAMS, E. et SMITH, E. L., J. Biol. chem., 1951, 191, 651.

(2) ALBERT, A., Human Pituitary Gonadotropins, c. c. Thomas, pub. 1961.

(3) APOSTOLAKIS, M. et VOIGT, K. D., Acta Endocrinol. 1958, 28, 54.

(4) ARON, M., Etudes d'endocrinologie, pub. sous la direction de R. COURRIER ; Ed. par Hermann. Paris, 1961 p 109.

(5) ASCHHEIM, P., Bruxelles Medical, 1954, 34, 2355.

(6) ASCHHEIM, S., Zeitsch. für Geburt. und Gynak. 1929, 95.

(7) ASCHNER, B., Arch. für Gynakol., 1913, 99, 534.

(8) BABINSKI, Société de Neurologie 7-6-1900.

(9) BEAVEN, G. H. et HOLIDAY, E. R., Adv. Protein chem., 1952, 7, 319.

(10) BENCZE, V. L. et SCHMID, K., Anal. chem., 1957, 29, 1193.

(11) BENOIT, J. et Da LAGE, C., Cytologie de l'adénohypophyse ; Colloques Internationaux du CNRS - 1963.

(12) BETTENDORF, G., APOSTOLAKIS, M. et VOIGT, K. D., Acta Endocrinol., 1962, 41, 1.

(13) BLACKBURN, S. et LOWTHER, A. G., Biochem., 1951, 48, 126.

(14) BLISS, C. I., The statistics of Bioassay, Academic Press New-York 1952.

(15) BLIX, G., Z. Physiol. chem., 1936, 240, 43.

(16) BOCCABELLA, A. V., Endocrinology 1963, 72, 787.

(17) BROWN, P. S., J. Endocrinol. 1955, 13, 59.

(18) BUTT, W. R., CROOKE, A. C. et CUNNINGHAM, F. J., Biochem. J. 1961, 81, 596.

(19) CAHILL, C. L., SHETLAR, M. R. et PAYNE, R. W., Fed. Proceed., 1962, 21, 197.

(20) CHEN, G. et Van DYKE, H. B., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1940, 40, 172.

(21) CHOW, B. F., GREEP, R. O. et Van DYKE, H. B., J. Endocrinol., 1939, 1, 440.

(22) CLERMONT, Y., The Am. Journ. of Anatomy, 1962, 111, 111.

(23) CLERMONT, Y. et MORGENHALTER, H., Endocrinology 1955, 57, 369.

(24) COURRIER, R., Endocrinologie de la gestation. Masson Ed. 1945.

(25) COURRIER, R., Etudes d'Endocrinologie, Seminaires du Collège de France. Pub. par Hermann Paris 1961.

(26) COURRIER, R., Acta Endocrinol. 1964, 90, 29.

(27) COURRIER, R. et KEHL, R., C.R. Soc. Biol. 1929, 100, 711.

(28) COURRIER, R., COLONGE A., HERMIER, C. et JUTISZ, M., C.R. Acad. Sci., 1964, 259, 643.

(29) COWIE, A.T. et FOLLEY, S.J , The Hormones, ed. par G. Pincus et R. Thimann, 1955, Vol. III, p. 309.

(30) DESCLIN, J. et ORTAVANT, R., Ann. Biol. anim. biochem. biophys., 1963, 3, 329.

(31) DICZFALUSY, E. et HEINRICHS, H.D., Archiv. für Gynakol., 1956, 187, 556.

(32) DISCHE, Z. et SHETTLES, L.B., J. Biol. chem., 1948, 175, 595.

(33) DIXON, G.H., KAUFFMAN, D.L. et NEURATH, H., J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 1260.

(34) Van DYKE, H.B. et WALLEN-LAWRENCE, Z., J. Pharmacol. 1933, 47, 163.

(35) Van DYKE, H.B., P'an, S.Y. et SHEDLOVSKY, T., Endocrinology 1950, 46, 563.

(36) ELLIS, S., J. Biol. Chem. 1958, 233. 63.

(37) ELLIS, S., Human Pituitary Gonadotropins, ed. par Albert. c.c. Thomas, pub. New-York 1961 p. 289.

(38) ELLIS, S., Human Pituitary Gonadotropins, c.c. Thomas, pub. New-York 1961 p. 378.

(39) EVANS, H.M. et LONG, J.A., Anat. Record, 1922, 23, 19.

(40) EVANS, H.M., KORPI, K., SIMPSON, M.E., PENCHARZ, R.I. et WONDER, D.H., Univ. Calif. Publi. in Anat. 1936, 1, 255.

(41) EVANS, H.M., SIMPSON, M.E., TOLKSDORF, S. et JENSEN, H., Endocrinology 1939, 25, 529.

(42) EVANS, H.M., SIMPSON, M.E., The Hormones ed. by G. Pincus and R. Thimann, New-York Academic, Press. Inc. 1950, Vol. II, 351.

(43) FEVOLD, H.L., Endocrinology, 1939, 24, 435.

(44) FEVOLD, H.L., Ann. N.Y. Ac. Sci., 1943, 43. 321.

(45) FEVOLD, H.L., HISAW, F.L. et LEONARD, S.L., The Am. Jour. Physiol., 1931, 97, 291.

(46) FEVOLD, H.L., LEE, M., HISAW, F.L. et COHN, E.J., Endocrinology, 1940, 26, 999.

(47) FRAENKEL-CONRAT, H.L., SIMPSON, M.E., EVANS, H.M., An. Fac. Med. Montevideo, 1940, 25, 159.

(48) FRAENKEL-CONRAT, H.L., SIMPSON, M.E. et EVANS, H.M., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1940. 45, 627.

(49) FRAENKEL-CONRAT H. L., HARRIS, J. I. et LEVY, A. L., Methods of Biochemical Analysis (Glick D) Interscience Pub. 1955, T2, 359.

(50) FRÖHLICH., Wien. Klin. Rundschan, 1901, 15, 883.

(51) GOA, J., Scand. J. Clin. Lab. Inv., 1953, 5, 218.

(52) GOTTSCHALK, A., WHITTEN, W. K. et GRAHAM, E. R. B., Biochem. Biophys. Acta 1960, 38, 183.

(53) GREEP, R. O., Van DYKE, H. B. et CHOW, B. F., J. Biol. Chem., 1940, 133, 289.

(54) GREEP, R. O., Van DYKE, H. B. et CHOW, B. F., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1941, 46, 644.

(55) GRÖSCHEL, U. et LI, C. H., Biochem. Biophys. Acta, 1960, 37, 375.

(56) HALEY, T. J., J. Am. Pharm. Assoc., 1950, 39, 136.

(57) HAYS, E. E. et STEELMAN, S. L., The Hormones, édit. par Pincus, G. et Thimann. R., New-York Academic Press. Inc., 1955, T III, 201.

(58) HENRY, R., dans Etudes d'Endocrinologie, pub. sous la direction de R. COURRIER, Edit. par Hermann Paris 1961 p. 126.

(59) HERLANT, M., Bull. Soc. Royale Belge Gynec. et obst., 1962, 32, 97.

(60) HERLANT, M., International Rewiew of cytology 1964, 17, 299.

(61) HERMIER, C., Etudes d'Endocrinologie sous la Direction de R. COURRIER, Edit. par Hermann Paris 1961, p. 19.

(62) HUTCHINSON, J. S. M. et ROBERTSON, H., Nature 1960, 188, 585.

(63) JANSEN, E. F., NATTING, M. D. F., JANG, R. et BALLS, A. K., J. Biol. chem., 1949, 179, 189.

(64) JENSEN, H., SIMPSON, M. E., TOLKSDORF. S. et EVANS, H. M., Endocrinology 1939, 25, 57.

(65) JOHNSEN, S., dans Human Pituitary gonadotropins ed. par Albert, c. c. Thomas Pub. New-York 1961 p. 271.

(66) JUTISZ, M., Etudes d'endocrinologie pub. sous la direction de R. COURRIER Ed. par Hermann Paris 1961, p. 3.

(67) JUTISZ, M., dans chromatographie en chimie organique et biologique, publiée sous la direction de E. LEDERER, Vol II p. 437.

(68) JUTISZ, M., KAMINSKI, M. et LEGAULT-DEMARE, J., Biochem. Biophys. Acta, 1957, 23, 173.

(69) JUTISZ, M., HERMIER, C., COLONGE, A. et COURRIER, R., C. R. Acad. Sci., 1960, 250, 431.

(70) JUTISZ, M., HERMIER. C., COLONGE, A. et COURRIER, R., C. R. Acad. Sci., 1961, 252, 3922.

(71) JUTISZ, M., HERMIER, C., COLONGE, A. et COURRIER, R., C. R. Acad. Sci., 1963, 256, 3922.

(72) JUTISZ, M., HERMIER, C., COLONGE, A. et COURRIER, R., Exposé au VI° Congrès International de Biochimie, New-York, 1964.

(73) KOENIG, V. L. et KING, E., Arch. Biochem. 1950, 26, 219.

(74) LEGAULT-DEMARE, J., CLAUSER, H. et JUTISZ, M., Bull. Soc. chim. Biol., 1961, 43, 897.

(75) LEONORA, J., McSHAN, W. H. et MEYER, R. K., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1956, 92, 524.

(76) LEVY, A. L., Nature 1954, 174, 126.

(77) LI, C. H. et EVANS, H. M., The Hormones ed par Pincus G. et Thimann R. New-York Academic Press Inc. 1948, TI, p. 631.

(78) LI, C. H., Vitamins and Hormones 1949, T VII p. 223.

(79) LI, C. H., SIMPSON, M. E. et EVANS, H. M., Science 1949, 109, 445.

(80) LI, C. H., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2815.

(81) LI, C. H. et HARRIS, J. I., An. Rev. Biochem. 1952, 21, 603.

(82) LI, C. H., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1958, 98, 839.

(83) LI, C. H., SQUIRE, P. G., et GROSCHEL, U. Arch. Biochem. Biophys. 1960, 86, 110.

(84) LI, C. H. et PEDERSEN, K. O., J. Gen. Physiol., 1952, 35, 629.

(85) LISON, L. Statistique appliquée à la biologie expérimentale. Gauthiers-Villars Paris 1958.

(86) LLOSA, P. de la., communication personnelle.

(87) LOSTROH, A. J., Acta Endocrinol., 1963, 43, 592.

(88) LOSTROH, A. J., JOHNSON, R. et JORDAN, C. W. Jr., Acta Endocrinol. 1963, 44, 536.

(89) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J., J. Biol. chem. 1951, 193, 265.

(90) LUSTIG, B. et LANGER, A. Biochem. Z., 1931, 242, 320.

(91) Mc KENZIE, J. M., Endocrinology 1958, 63, 372.

(92) McSHAN, W. H. et MEYER, R. K., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1939, 40, 699.

(93) McSHAN, W. H., KAGANA, C. M. et MEYER, R. K., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1954, 85, 393.

(94) McSHAN, W. H. et MEYER, R. K., Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 1955, 88, 278.

(95) MARESCAUX, J. et ARON, M., C. R. Soc. Biol. 1962, 156, 895.

(96) MARTIN, R. G. et AMES, B. N., J. Biol. Chem. 1961, 236, 1372.

(97) MEYER, M. L. et KAUZMANN, W., Arch. Biochem. Biophys. 1962, 99, 348.

(98) MOORE, S. et STEIN, W. H., J. Biol. chem. 1954, 211, 893 et 907.

(99) MORTON, R. K., Methods In Enzymology 1955, Vol I, p. 46.

(100) ORTAVANT, R. et COUROT, M., Arch. de Biologie (Liège) 1964-75. (sous presse).

(101) ORTAVANT, R. et THIBAULT, C., Proceed. of the Second World Congress on Fertility and Sterility, Naples 1956.

(102) PAPKOFF, H., CANDIOTTI, A. et LI, C.H., Fed. Proceed., 1964, 23, 410.

(103) PARLOW, A.F., Fed. Proceed., 1958, 17, 402.

(104) PARLOW, A.F., dans Human Pituitary Gonadotropins Pub. par Albert, c.c. Thomas Ed., N.Y. 1961 p. 300-310.

(105) PARLOW, A.F., et REICHERT, L.E., Endocrinology 1963, 73, 377.

(106) PARTRIDGE, S.M. et ELSDEN, D.F., Biochem. J., 1961, 80, 34 P.

(107) PELLETIER, J., These doctorat 3ème cycle, Paris 1963.

(108) PETERSON, E.A. et SOBER, H.A., J. Am. chem. Soc. 1956, 78, 751.

(109) PHILLIPS, D.M.P., Biochem. J., 1958, 68, 35.

(110) PIEZ, K.A. et MORRIS, L., Analytical Biochem. 1960, 1, 187.

(111) PORATH, J. et FLODIN, P., Nature 1959, 183, 1657.

(112) PORATH, J., LINDNER, E.B. et JERSTEDT, S., Nature 1958, 182, 744.

(113) RAACKE, I.D., LOSTROH, A.J. et LI, C.H., Arch. Biochem. Biophys. 1958, 77, 138.

(114) REICHERT, L.E. Jr. et PARLOW, A.F., Endocrinology 1963, 7 , 224.

(115) REICHERT, L.E. Jr. et PARLOW, A.F., Endocrinology 1964, 74, 236.

(116) REISS, M. et HAUROWITZ, F., Z. Ges. Exp. Med. 1929, 68, 371.

(117) ROMEIS, B., Hrsg, von W.v Mollendorf Bd 6.3 Teil. Berlin, J. Springer 1940, p. 625.

(118) ROOS, P. et GEMZELL, C.A., Ciba Foundation Colloq. Endocrinol. 1960, 13, 269.

(119) SANGER, F., Biochem. J. 1945, 39, 507.

(120) SAXENA, B.B., McSHAN, W.H. et MEYER, R.K., Biochem. Biophys. Acta 1962, 65, 394.

(121) SCHALLY, A.V. et GUILLEMIN, R., Texas Reports on Biology and Medicin 1960, 18, 133.

(122) SEGALOFF, A., Human Pituitary Gonadotropins ed. par Albert. c.c. Thomas Pub. N.Y. 1961 p. 355.

(123) SIMPSON, M.E., LI, C.H. et EVANS, H.M., Endocrinology 1951, 48, 370.

(124) SMITH, P.E., Anat. Record, 1926, 32, 221.

(125) SORET, J.L., Arch. Sci. Phys. Nat. 1883, 1, 429.

(126) SPACKMAN, D.H., STEIN, W.H. et MOORE, S., Anal. chem. 1958, 30, 1190.

(127) SQUIRE, P.G. et LI, C.H., Science 1958, 127, 32.

(128) SQUIRE, P.G. et LI, C.H., J. Biol. chem. 1959, 234, 520.

(129) STEELMAN, S.L. et POHLEY, F.M., Endocrinology 1953, 53, 604.

(130) STEELMAN, S.L., LAMONT, W.A., DITTMAN, W.A. et ERVIN, J., Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 1953, 82, 645.

(131) STEELMAN, S.L., Endocrinology 1955, 56, 216.

(132) STEELMAN, S.L., LAMONT, W.A. et BALTES, B.J., Acta Endocrinol. 1956, 22, 186.

(133) STEELMAN, S.L., KELLY, T.L., SEGALOFF, A. et WEBER, G.F., Endocrinology 1956, 59, 256.

(134) STEELMAN, S.L., Biochem. Biophys. Acta, 1958, 27, 405.

(135) STEELMAN, S.L., SEGALOFF, A. et ANDERSEN, R.N., Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 1959, 101, 452.

(136) STEELMAN, S.L. et SEGALOFF, A., Recent Progres in Hormone Research 1959, XV, 115.

(137) SVENSSON, H., Arch. Biochem. Biophys. 1962 Supp. I, 132.

(138) TISELIUS, A., PORATH, J., ALBERTSSON, P.A., Science 1963, 141, 13.

(139) WALLEN-LAWRENCE, Z., J. Pharmacol. Expl. Therap. 1934, 51, 263.

(140) WARD, D.N., McGREGOR, R.F. et GRIFFIN, A.C., Biochem. Biophys. Acta, 1959, 32, 305.

(141) WARREN, L., J. Biol. chem. 1959, 234, 1971.

(142) WERTH, G., Arzneimittel-Forschung 1955, 8, 409.

(143) WESTPHAL, U., Ergebn. der Physiol., 1940, 43, 421.

(144) WINZLER, J., Methods of Biochem. Analysis, Interscience Pub. 1955, 2, 279.

(145) WITSCHI, E., Endocrinology 1940, 27, 437.

(146) WITSCHI, E., Memoirs Soc. Endocrinol., Ed. I.C. Jones et P. Eckstein, University Press, Cambridge 1955, 4, 149.

(147) WITSCHI, E., Cold Spring. Harbor Symposia, 1937, 5, 180.

(148) WOODS, M.C. et SIMPSON, M.E., Fed. Proceed. 1959, 18, 687.

(149) WOODS, M.C. et SIMPSON, M.E., Endocrinology 1960, 66, 575.

(150) WOODS, M.C. et SIMPSON, M.E., Endocrinology 1961, 69, 91.

(151) ZONDEK, B. et ASCHHEIM, S., Klin. Wtsh. 1927, 6, 248.

(152) ZONDEK, B. Zeitsch. für Geburt. und Gynak. 1926, 90, 372.

# TABLE DES MATIÈRES


Pages

INTRODUCTION ..... 4

CHAPITRE I : HISTORIQUE

A - Découverte des gonadotropines ..... 6
B - Propriétés biologiques et dosages des gonadotropines ..... 7
C - Origine cytologique de la FSH ..... 10
D - Méthode d'extraction et de purification de la FSH ..... 11
E - Propriétés physico-chimiques ..... 22

CHAPITRE II : METHODES DE DOSAGE BIOLOGIQUE

A - Etalons et Unités FSH et LH ..... 25
B - Dosage de la FSH ; Méthode de STEELMAN et POHLEY ..... 25
C - Dosage de LH :

I - Méthode de PARLOW ..... 27
II - Méthode de GREEP et coll ..... 28

D - Dosage de TSH : Méthode de Mc KENZIE ..... 28

CHAPITRE III : ETUDE DES METHODES DE PURIFICATION DE LA FSH

A - Période de prélèvement des hypophyses ..... 30
B - Poudre acétonique, Poudre butanolique conservation des glandes ..... 30
C - Techniques d'extraction et méthodes de fractionnement préliminaires ..... 31

I - Essais préliminaires des conditions d'extraction .... 31
II - Etudes des conditions de fractionnement ..... 34

1° stade : abaissement du pH ..... 34
2° stade : précipitation par le sulfate d'ammonium.. 35
3° stade : fractionnement par l'éthanol en présence d'acétate de zinc ..... 37
4° stade 1/ chromatographie sur échangeur de cations ..... 39
2/ chromatographie sur échangeur d'anions. 41

Pages

5° stade 1/ chromatographie sur Amberlite IRC 50.. 46
2/ chromatographie sur CM-cellulose ..... 46
3/ Filtration sur gel Sephadex ..... 49
4/ Electrophorèse de zone ..... 59

CHAPITRE IV : METHODE ACTUELLE DE PREPARATION DE LA FSH

A - Préparation des poudres acétoniques et butanoliques ..... 62
B - Extraction à partir de la poudre butanolique ..... 63
C - Fractionnement de l'extrait brut ..... 63

1° stade : précipitation en milieu acide ..... 63
2° stade : fractionnement par le sulfate d'ammonium ..... 63
3° stade : fractionnement par l'éthanol en présence d'acétate de zinc récupération de Zn R 80 64
4° stade : chromatographie sur DEAE-cellulose ... 65
Récupération et conservation de la fraction "De" ..... 65
5° stade : Filtration sur Gel Sephadex G 100 ..... 66
Récupération et conservation de la fraction "Sx" ..... 66

CHAPITRE V : ETUDE DE L'HOMOGENEITE, DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET DE LA STABILITE DE LA FSH.

A - Ultracentrifugation en gradient de saccharose. Détermination de la constante de sédimentation et du poids moléculaire ..... 69
B - Méthode de condensation isoélectrique détermination du pH isoélectrique ..... 74
C - Etude électrophorétique de la FSH préparée par filtration sur Gel Sephadex G 100 ..... 78

I - Electrophorèse sur colonne de Pevikon ..... 78
II - Electrophorèse sur colonne de Sephadex G 25 ..... 82
III - Electrophorèse de zone sur rigole d'amidon ..... 82

D - Etude de la stabilité biologique de la FSH ..... 84
E - Etude colorimétrique de la FSH ..... 95
F - Composition chimique de la FSH ..... 97

CHAPITRE VI - PROPRIETES BIOLOGIQUES

A - Dosages biologiques des activités FSH, LH et TSH de la fraction "Sx" ..... 103
B - Variation du rapport FSH/LH ..... 104
C - Etudes de différentes préparations de FSH chez le rat mâle hypophysectomisé ..... 104

I - Etudes de préparation de FSH obtenues par chromatographie sur Amberlite IRC 50 ..... 107
II - Etude des fractions "De" et "Sx" ..... 109

Pages

1/ Rats adultes hypophysectomisés depuis 4 mois... 109
2/ Rats impubères hypophysectomisés depuis 15 jours. 112

DISCUSSION ..... 119

RESUME CONCLUSION ..... 123

BIBLIOGRAPHIE ..... 125

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

"DOSAGES IMMUNOLOGIQUES DES HORMONES ANTEHYPOPHYSAIRES"
ANTIHORMONES.

Vu et approuvé :

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY

Vu

et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie
de Paris,
Jean ROCHE

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN
Ouvrages scientifiques
TYPO-OFFSET
GAP (Hautes-Alpes)

Dépôt légal n° 347
1966